

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt
Pneumologie in der klinischen Forschergruppe „Chronische
Atemwegserkrankungen“
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg**

Leiter: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier



**Auswirkung einer inhalativen
Stickstoffdioxidexposition der Ratte auf die
pulmonalen Alveolarsepten unter besonderer
Berücksichtigung des extrazellulären Fasergerüsts**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg**

**vorgelegt von
Ellen Starke
aus Berlin-Köpenick**

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 19.12.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund
Referent: Prof. Dr. H. Fehrenbach
Korreferent: Prof. Dr. A. Pagenstecher

Es gibt keine großen Entdeckungen und Fortschritte,
solange es noch ein unglückliches Kind auf Erden gibt.

Albert Einstein

Inhalt

1. Einleitung	6
1.1 Aufbau und Funktion der Lunge	6
1.2 Lichtmikroskopischer Aufbau des Lungenparenchyms	6
1.3 Ultrastruktur der Alveolarsepten	7
1.4 Extrazelluläre Fasern	10
1.4.1 Kollagen	11
1.4.3 Extrazelluläres Fasergerüst.....	12
1.5 COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)	12
1.5.1 Geschichte der Erforschung der COPD.....	14
1.5.2 Tiermodelle in der Erforschung der COPD.....	16
2. Ziel der Arbeit	19
3. Material und Methoden	21
3.1 Versuchstiere und Versuchsdurchführung.....	21
3.1.1 Stickstoffdioxidexposition der Versuchstiere.....	21
3.1.2 Organentnahme und Fixierung	22
3.1.3 Probengewinnung	22
3.1.4 Probenaufbereitung.....	23
3.2 Versuchsauswertung	24
3.2.1 Lichtmikroskopische Auswertung.....	24
3.2.2 Vorbereitung der elektronenmikroskopischen Auswertung.....	24
3.2.3 Datenanalyse.....	25
3.2.4 Elektronenmikroskopische Auswertung.....	27
3.2.5 Berechnung der Volumina der septalen Strukturen.....	27
3.2.6 Normierung der Volumina auf das Körpergewicht	29
3.3 Statistik	29
4. Resultate	31
4.1 Qualitative lichtmikroskopische Beurteilung	31
4.2 Versuchsgruppen	31

4.3 Körpergewicht	31
4.4 Lungenvolumina.....	33
4.5 Elektronenmikroskopie.....	35
4.5.1 Qualitative Beurteilung der Ultradünnschnitte am Elektronenmikroskop ...	35
4.5.2 Quantitative Analyse der Ultrastruktur der Alveolarsepten	39
5. Diskussion	48
5.1 Untersuchungsrelevante Rahmenbedingungen.....	48
5.1.1 Bedeutung der COPD	48
5.1.2 Forschung an Tiermodellen	49
5.1.3 Einsatz von Stickstoffdioxid im Tierversuch	49
5.1.4 Auswahl der Versuchstiere.....	50
5.2 Diskussion der Versuchsergebnisse.....	50
5.3 Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse im Gesamtkontext der Studie	54
5.4 Schlussfolgerung	58
6. Zusammenfassung	59
7. Summary.....	60
8. Literatur	61
9. Abkürzungen	69
Anhang	71

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Lunge

Um ihre Grundfunktion, die Versorgung des Organismus mit sauerstoffreichem Blut, wahrnehmen zu können, muss in der Lunge ein Gasaustausch stattfinden. Das heißt, es muss ausreichend Sauerstoff aus der Umgebungsluft ins Blut gelangen, und Kohlenstoffdioxid muss aus dem Blut an die Luft abgegeben werden können. Diese Prozesse finden ausschließlich per Diffusion statt. Damit diese Diffusion bestmöglich stattfinden kann, müssen verschiedene Bedingungen erfüllt sein: Die Ventilation, also die Einatmung frischer und die Ausatmung ausgetauschter Luft sollte so erfolgen, dass bei jedem Atemzug die gesamte am Gasaustausch teilnehmende Oberfläche gleichmäßig mit Frischluft versorgt wird (17). Für einen optimalen Gasaustausch zwischen Blut und Luft muss die sie trennende Barriere möglichst dünn bei möglichst großer Oberfläche sein (91). Diese Anforderungen bedingen den speziellen Aufbau der Lunge.

1.2 Lichtmikroskopischer Aufbau des Lungenparenchyms

Beim ersten Blick ins Lichtmikroskop erscheint die Lunge als größtenteils luftgefüllter Raum, der durch alveoläre Septen in kleinere Einheiten unterteilt wird. In der lichtmikroskopischen Vergrößerung sind bereits einige Details der Alveolarsepten erkennbar. Die Oberfläche wird von einem flachen Epithel aus Pneumozyten Typ I bedeckt, gelegentlich ist ein Zellkern angeschnitten. In den Nischen der Alveolen sind rundliche Zellen mit vakuolisiertem Zytoplasma, die Pneumozyten Typ II, erkennbar. Auf der Oberfläche der Alveolarsepten finden sich gelegentlich Alveolarmakrophagen (84).

Um die extrazelluläre Matrix mit den darin enthaltenen Fasersystemen darzustellen, sind Spezialfärbungen notwendig. So lässt sich Kollagen beispielsweise durch Sirius Rot (37) gezielt anfärben, und Elastin wird zum Beispiel mit der Hart's Stain Färbung (97) dargestellt.

1.3 Ultrastruktur der Alveolarsepten

Die Elektronenmikroskopie ermöglicht die circa 1.000- bis 100.000fach vergrößerte Darstellung von Objekten. Mit diesen hohen Vergrößerungen sind die Alveolarsepten detailliert beurteilbar. Sie setzen sich aus verschiedenen Zelltypen und einem interstitiellen Raum zusammen.

Die äußere Schicht und damit die Abgrenzung zur Luft bilden die Pneumozyten Typ I. Diese Zellen bestehen zum großen Teil aus dünnen, flächig ausgedehnten zytoplasmatischen Ausläufern, welche kaum Organellen enthalten. Entgegen früherer Annahmen stehen diese dünnen Zellplatten alle mit einem Zellkern in Verbindung. Aufgrund ihrer geringen Stoffwechselaktivität, und um den Gasaustausch nicht zu behindern, enthalten diese Zellen kaum Organellen (91).

Die Pneumozyten Typ I sind untereinander durch verschiedene Interzellularkontakte verbunden. Hervorzuheben sind dabei die Tight Junctions, die in Form mehrerer hintereinandergestellter Leisten vorliegen und so den Interzellularraum für diffundierende Moleküle komplett abdichten (15). Damit ist ein Stofftransport ausschließlich durch den Intrazellularraum der Pneumozyten Typ I möglich. Obwohl Pneumozyten Typ I einen sehr geringen Gehalt an Organellen aufweisen, haben sie dennoch wichtige vor allem regulatorische Aufgaben, zum Beispiel bei Transportvorgängen, der Modulation des Abwehrsystems sowie bei der Steuerung der Zellteilung (96). Die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen die Pneumozyten Typ I aufgrund ihrer Differenzierung jedoch nicht mehr. Epitheldefekte müssen daher durch eine andere Zellpopulation repariert werden, den Pneumozyten Typ II. Diese können sich nach der Mitose in Pneumozyten Typ I differenzieren.

Obwohl das Volumen eines Pneumozyten Typ II im Verhältnis zu dem eines Pneumozyten Typ I nur etwa die Hälfte beträgt, fallen diese Zellen beim Blick ins Mikroskop sofort auf. Es handelt sich um kuboidale Zellen ohne flache Zytoplasmaausläufer, deren Oberfläche mit kurzen Mikrovilli besetzt ist. Entsprechend ihrer hohen Stoffwechselaktivität besitzen diese Zellen eine reiche Ausstattung an verschiedensten Organellen (91). Charakteristisch für die Pneumozyten Typ II sind die sogenannten Lamellarbodies, größere Organellen, die einen dichtgepackten Stapel aus

Phospholipidlamellen enthalten. Diese bestehen zum großen Teil aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), einer oberflächenaktiven Substanz, die sich aus einer hydrophilen Gruppe aus Glycerinphosphat und Cholin sowie zwei hydrophoben Fettsäureresten zusammensetzt (91). Durch diese Eigenschaft bildet sich, nach Sekretion in den Alveolarraum, an der Grenze zwischen der Alveolaroberfläche und der intraalveolären Luft ein monomolekularer Film. Gemeinsam mit ebenfalls von den Pneumozyten Typ II sezernierten Surfactant-spezifischen Proteinen ist diese Phospholipidschicht, der Surfactant, in der Lage, die Oberflächenspannung in der Alveole zu regulieren. In Inspirationsstellung wird die Ausatmung durch eine hohe Oberflächenspannung begünstigt. Durch die drastische Senkung der Oberflächenspannung wird dagegen in Expirationsstellung durch einen als "Squeeze-out" bekannten Prozess, bei dem DPPC in der Grenzschicht konzentriert wird, ein Kollaps der Alveolen verhindert (57, 67).

Die Wand der alveolären Kapillaren bildet ebenso wie das Oberflächenepithel einen Teil der Diffusionsbarriere für den Gasaustausch, aufgrund der daraus resultierenden Anforderungen sind die Endothelzellen ähnlich wie die Pneumozyten Typ I aufgebaut. Eine relativ flache Zytoplasmaschicht, die wenige Organellen enthält, breitet sich vom Zellkern her aus. Untereinander sind die Endothelzellen ebenso wie die Pneumozyten durch Interzellularkontakte miteinander verbunden. Die Tight Junctions sind hier jedoch durchlässiger und erlauben einen relativ ungehinderten Austausch von Wasser und darin gelösten Substanzen zwischen Blutplasma und interzellulärer Flüssigkeit (91).

Zwischen Epithel und Endothel befindet sich der Bindegewebsraum der Alveolarsepten. Als Anpassung an die Anforderung, ein möglichst geringes Diffusionshindernis für den Gasaustausch darzustellen, ist er sehr schmal. Über die Hälfte der Kontaktfläche zwischen Epithel und Endothel sind lediglich von einer einzigen Basallamina getrennt, die aus der Verschmelzung der Basallaminae der beiden Zellschichten entstanden ist (93). Trotz seines geringen Volumens erfüllt der Bindegewebsraum wichtige Aufgaben. Mit Hilfe eines weit verzweigten extrazellulären Fasersystems wird die nötige mechanische Festigkeit bei gleichzeitig

bestehender Flexibilität erreicht, um den ständig wechselnden Beanspruchungen standzuhalten, die während jedes Atemzuges entstehen. Der interzelluläre Flüssigkeitsraum steht mit dem Lymphsystem in Verbindung (91). Die Zellen des Bindegewebsraumes sind die Fibroblasten, welche die extrazellulären Fasern produzieren und mit ihren langen und zum Teil verzweigten Zytoplasmaausläufern in engem Kontakt zu ihnen stehen. Außerdem befinden sich hier migrationsfähige Zellen, wie z. B. Mastzellen, die nach Durchwanderung des Endothels aus den Kapillaren in den interstitiellen Raum gelangt sind.

Da die Lunge eine außerordentlich große Oberfläche mit Kontakt zur Umwelt besitzt, ist sie sehr vielen schädigenden Substanzen und Mikroorganismen ausgesetzt. Sie benötigt daher ein gut funktionierendes Abwehrsystem.

Das Abwehrsystem des Respirationstraktes beginnt schon in den in der Nasenhöhle mit der Erwärmung und Anfeuchtung der Atemluft (17). Das gesamte luftleitende System bis zu den Bronchiolen ist von einem Flimmerepithel ausgekleidet. Zwischen die Epithelzellen sind Becherzellen eingestreut, die einen zähen Schleim sezernieren. Durch rhythmische Schläge der Kinozilien, die die Flimmerepithelzellen an ihrer Oberfläche tragen, wird der Schleimfilm mitsamt eingeatmeter Partikel und Krankheitserreger in Richtung Pharynx transportiert. Dort angelangt, wird er meist unbemerkt verschluckt. Dieses System wird bei Ansammlung größerer Schleimmengen durch Husten unterstützt (52, 91).

Das hoch- bis isoprismatische Flimmerepithel der Atemwege wird beim Übergang von den Bronchiolen zu den Alveolen durch ein einfaches Plattenepithel ohne Kinozilienbesatz ersetzt. Aus diesem Grund sind hier andere Verteidigungsstrategien anzutreffen (91). Die meisten an der Abwehr beteiligten Zellen befinden sich innerhalb der Alveolarsepten. Auf histologischen Schnitten fallen jedoch zuerst die Alveolarmakrophagen auf, die nicht innerhalb der Septen sondern auf der Epitheloberfläche im Luftraum der Alveolen liegen. Diese Zellen stammen aus dem Knochenmark. Sie zirkulieren als Monozyten im Blutstrom, bevor sie die Kapillaren der Alveolarsepten verlassen, das Epithel durchdringen und sich mit ihren vielen Fortsätzen nun frei auf der Oberfläche der Pneumozyten

bewegen können (17). Mit diesen sogenannten Pseudopodien sind sie in der Lage, eingedrungene Partikel oder Krankheitserreger zu umfließen und einzuschließen. Die phagozytierten Fremdstoffe können dann mit Hilfe lysosomaler Enzyme verdaut werden. Da dieser Mechanismus nicht antigenvermittelt ist, zählt er zur unspezifischen Infektabwehr (91).

Die Pneumozyten Typ II sezernieren den Surfactant. Neben Phospholipiden enthält dieser auch Proteine, unter anderem die Surfactantproteine A und D, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der unspezifischen Abwehr spielen. Sie binden an Oberflächenproteine von Mikroorganismen und interagieren mit Immunzellen, die ihrerseits Entzündungsreaktionen einleiten oder markierte Fremdpartikel phagozytieren (52).

Die spezifische antigengebundene Abwehr läuft in der Lunge nach den gleichen Prinzipien wie auch in anderen Organen ab, Immunzellen wie Lymphozyten und Plasmazellen finden sich im Interstitium, insbesondere in der Umgebung von Blutgefäßen und Bronchien (91).

1.4 Extrazelluläre Fasern

Die elastische Rückstellkraft der Lunge wirkt dem ständig von außen einwirkenden Zug entgegen, der durch den Unterdruck im Pleuraspalt entsteht. Den größten Beitrag zu dieser Gewebsspannung leistet das Lungenparenchym. Andere anatomische Strukturen wie Bronchialsystem, Blutgefäße, interlobuläre Septen und viscerale Pleura tragen nur einen geringen Teil hierzu bei (62). Mögliche Träger der elastischen Rückstellkraft der Lunge sind die extrazellulären Fasern Elastin und Kollagen sowie die Oberflächenspannung der Alveolarsepten, wobei die extrazellulären Fasern einen wichtigen Beitrag zu dieser Kraft leisten (63).

Elastin und Kollagen sind Bestandteil der verschiedenen anatomischen Strukturen der Lunge. Diese Fasern bilden ausgehend von den Wänden der Bronchioli und des peribronchialen Gewebes über die Alveolen bis in das lockere Bindegewebe unter der visceralen Pleura ein kontinuierliches Netzwerk (93). In den folgenden Abschnitten soll auf das Elastin und Kollagen innerhalb der Alveolarsepten näher eingegangen werden.

1.4.1 Kollagen

Beim Kollagen handelt es sich um eine Familie nahe verwandter Proteine, durch deren Zusammenlagerung Filamente, Fibrillen oder Maschenwerke entstehen. Je nachdem, aus welchen Proteinketten das Kollagen besteht, entstehen unterschiedliche Makromoleküle mit verschiedenen Eigenschaften. Beispielfhaft sollen hier das Kollagen Typ I, das Kollagen Typ III und das Kollagen Typ IV erwähnt werden, da dies die hauptsächlich in der Lunge vorkommenden Kollagentypen sind.

Kollagen Typ I bildet zugfeste Fasern mit einem Durchmesser von 1-10 μm , die sich zu dickeren Bündeln zusammenlagern können. Die Kollagenfasern bestehen aus 30-70 nm dicken Fibrillen. Kollagen Typ III bildet die sogenannten retikulären Fasern, ein dünnes Netzwerk aus Kollagen Typ III-Fasern. Es wird von jungen Fibroblasten z. B. im Rahmen der Wundheilung synthetisiert und kann in das festere Kollagen Typ I umgewandelt werden. Die Basalmembranen von Alveolarepithel und –endothel bestehen wie die Basalmembranen im gesamten Körper aus Kollagen Typ IV.

In den hohen elektronenmikroskopischen Vergrößerungen zeigen die einzelnen Kollagenfibrillen ein Querstreifenmuster. Dieses entsteht durch die versetzte Zusammenlagerung der einzelnen Tropokollagenmoleküle in den Fibrillen. In den in der Elektronenmikroskopie üblichen Anfärbungen mit Schwermetallsalzen lagern sich diese bevorzugt an Proteinen an, nicht jedoch in den Lücken zwischen den hintereinander liegenden Aminosäureketten, wodurch das beschriebene Streifenmuster entsteht (16).

Kollagenfasern sind praktisch nicht dehnbar. Eine Längenänderung, wie sie während der Atmung benötigt wird, ist jedoch dadurch ermöglicht, dass die Fasern im Ruhezustand nicht geradlinig verlaufen und so bei Dehnung des Gewebes gestreckt werden können. Eine weitere Dehnung, die zur Gewebeschädigung führen könnte, wird dann durch die Zugfestigkeit der Kollagenfasern verhindert (55).

1.4.2 Elastin

Elastische Fasern bestehen hauptsächlich aus zwei Proteinen, dem Elastin und dem Fibrillin. Elastin stellt sich elektronenmikroskopisch als

dunkelgraue amorphe Masse ohne erkennbare Binnenstruktur dar (63). Auf die Faser aufgelagert sind die stärker angefärbten Mikrofibrillen aus Fibrillin. Durch weitere Elastinauflagerung werden diese in die Faser integriert und dabei maskiert, sodass sie im Inneren der Elastinfaser nicht mehr erkennbar sind (16).

Elastin ist ein hydrophobes Protein, welches auf über das Doppelte seiner Ausgangslänge dehnbar ist und sich danach wieder auf seine ursprüngliche Länge zusammenzieht (63). Im entspannten Zustand liegen die Aminosäureketten in einer ungeordneten Wicklung vor, sie können bei Dehnung gestreckt werden. Bei Entspannung kehren die Aminosäureketten in einen anderen ungeordneten Wicklungszustand zurück (84).

1.4.3 Extrazelluläres Fasergerüst

Die extrazellulären Fasern sind nicht gleichmäßig über das Lungenparenchym verteilt. Sie befinden sich in einer dünnen Lage interstitieller Grundsubstanz in den Alveolarsepten, die auch die Fibrozyten enthält, welche für Produktion, Erhalt und Umbau des extrazellulären Fasergerüsts verantwortlich sind. Elastische Fasern treten dort auf, wo eine Gegenkraft zum Zug des Gewebes benötigt wird, um ein Septum aufgespannt zu halten. Dies sind besonders die alveolären Eintrittsöffnungen, die von jeweils einem Bündel elastischer Fasern umringt werden. Diese erscheinen auf histologischen Schnitten als freie Enden der Alveolarsepten, Endknöpfchen, an deren Spitze die elastischen Fasern quer geschnitten sind (62). In diesem Bereich finden sich auch dickere Bündel von Kollagenfasern (63). Die Fasern bilden ein über das gesamte Parenchym verteiltes zusammenhängendes weitmaschiges Netzwerk (17). Das zeigt sich darin, dass innerhalb der Septen immer wieder schmale Kollagenfaserbündel oder auch einzelne Kollagenfasern sowie dünne elastische Fasern anzutreffen sind (11).

1.5 COPD

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD = Chronic Obstructive Pulmonary Disease) ist definiert als chronische Lungenkrankheit mit einer Atemwegsobstruktion, die nicht vollständig

reversibel ist. Die Atemwegsobstruktion ist üblicherweise progredient und verbunden mit einer überschießenden Entzündungsreaktion auf einwirkende Noxen (68). Die COPD setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: einer chronisch obstruktiven Bronchitis mit Fibrose und Verengung der kleinen Atemwege durch eine vermehrte Schleimsekretion sowie dem Lungenemphysem mit Zerstörung des Lungenparenchyms und Vergrößerung der alveolären Lufträume, einem Verlust der Elastizität der Lunge und dem Verschluss der kleinen Atemwege (2, 77). Meist steht eine dieser beiden Komponenten im Vordergrund, eine Beschränkung auf ausschließlich eine Form ist selten (23, 12).

Der Verlust an Lungenparenchym führt zu einer Verkleinerung der für den Gasaustausch zur Verfügung stehenden Fläche. Die Entzündung der Bronchien mit einer vermehrten Schleimsekretion sowie ihre Instabilität erfordern eine vermehrte Atemarbeit. Diese Veränderungen treten prinzipiell auch während des Alterns im Rahmen des normalen Rückgangs der Lungenfunktion auf, sind bei der COPD jedoch beschleunigt (2).

Histopathologisch wird das Lungenemphysem in eine zentrilobuläre Form, bei der hauptsächlich die um den terminalen Bronchiolus liegenden Acini zerstört werden, von einer panazinären Form unterschieden. Letztere betrifft das gesamte Lungenparenchym homogener.

Ursächlich für die COPD sind exogene Noxen. Das Zigarettenrauchen ist in den Industrienationen mit Abstand der bedeutenste Risikofaktor (85). Daneben spielen aber auch endogene Faktoren, genetische Polymorphismen, eine Rolle. Ein Beispiel für einen genetischen Defekt, durch den ein Emphysem entsteht, ist der $\alpha 1$ -Antitrypsinmangel. Häufig wird jedoch keine spezifische genetische Veränderung identifiziert (32).

Das vorherrschende Symptom der COPD ist die Belastungsdyspnoe. Es kommt bereits im Frühstadium der Erkrankung zu einer Verminderung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Diese wird subjektiv häufig jedoch erst bemerkt, wenn es zu einer Einschränkung bei den Verrichtungen des täglichen Lebens kommt. Durch die gesteigerte Schleimsekretion kommt es zu produktivem Husten, der anfangs nur morgens auftritt. Mit Fortschreiten der Erkrankung werden tagsüber bis zu 60 ml glasiges Sputum produziert. Infolge der Atemwegsobstruktion kommt es zu einer Lungenüberblähung

mit Verschiebung der Atemruhelage in Richtung Inspiration. Aufgrund des resultierenden Zwerchfelltieftandes ist ein vermehrter Einsatz der Atemhilfsmuskulatur notwendig. Die Ruheatemfrequenz ist als Ausdruck des gestörten Gasaustausches mit Hypoxie und Hyperkapnie abhängig vom Schweregrad der Erkrankung erhöht. Als Folge des gestörten Gasaustausches kommt es oft zu einer Erhöhung des Hämatokrits und zur pulmonal-arteriellen Hypertonie. Häufig treten bakterielle Infektionen des geschädigten Bronchialsystems auf, die sich durch purulentes Sputum, eine Zunahme der Dyspnoe und allgemeine Infektionszeichen wie Fieber äußern. Ziele in der Therapie der COPD sind die Behandlung der vorhandenen Symptome sowie eine Verhinderung des Fortschreitens der Erkrankung. Weitere Therapieziele sind eine Steigerung der Lebenserwartung und eine rasche Kontrolle von Infektexazerbationen.

Wichtigste Maßnahme ist die Ausschaltung verursachender Noxen, also in den meisten Fällen ein Verzicht auf das Rauchen. Eine weitere bedeutende therapeutische Maßnahme ist die Sauerstofflangzeittherapie mit dem Ziel eines normnahen arteriellen Sauerstoffpartialdruckes, was einem weiteren Ansteigen des pulmonal-arteriellen Druckes vorbeugt, den Hämatokrit senkt und zu einer Steigerung der Lebenserwartung führt. An medikamentösen Optionen stehen verschiedene Bronchodilatoren, antiinflammatorische Medikamente (Steroide) sowie Mukolytika zur Verfügung. Ebenso sind die Prävention sowie die frühzeitige antibiotische Therapie von Infekten entscheidend (23).

Da mit all diesen Maßnahmen die Lungenfunktion jedoch nicht nachhaltig verbessert werden kann, besteht weiterer Forschungsbedarf sowohl bezüglich der Entstehung als auch der Therapie der COPD.

1.5.1 Geschichte der Erforschung der COPD

Das Lungenemphysem wurde zuerst von Laennec im Jahr 1834 beschrieben (41). Die Veränderungen, die er an Schnitten von in Inspirationsstellung luftgetrockneten menschlichen Lungen beobachtete, schrieb er einer Atrophie des Lungengewebes zu. Diese Hypothese von einer Atrophie des Lungengewebes als Ursache des Emphysems erschien noch 1940 in einem

Lehrbuch der Pathologie (51). 1959 erfolgte die Neudefinition des Emphysems als „abnorme permanente Erweiterung der Lufträume distal der Bronchioli terminales“ (9). Die Definition wurde 1985 erneut überarbeitet, um die „Zerstörung der Alveolenwände ohne sichtbare Fibrose“ einzuschließen (80). Schon in den 1950-iger Jahren führten Mc Lean und Leopold eine entzündliche Komponente in die Pathogenese der zentrolobulären Form des Emphysems ein (43, 53). Diese These wurde zunächst jedoch nur sehr zurückhaltend aufgenommen (32). Die Arbeiten von McLean und Leopold (43, 53) haben gezeigt, dass die zentroazinäre Form des Emphysems das Ergebnis einer Erweiterung und Zerstörung der Bronchioli terminalis ist. Das panazinäre Emphysem entsteht dagegen durch eine einheitlichere Zerstörung aller Azini innerhalb eines Lungenläppchens. Diese Form ist häufig mit einem genetisch bedingten α 1-Antitrypsinmangel vergesellschaftet.

Zur Erklärung der Pathogenese steht seit über 40 Jahren die Proteinase:Antiproteinase-Hypothese im Mittelpunkt (32). Verschiedene Studien konzentrierten sich zu Beginn der auf dieser Hypothese basierenden Forschung auf Proteinasen mit elastolytischer Aktivität wie die humane neutrophile Elastase. Durch nicht elastolytische Proteinasen konnte experimentell zunächst kein Emphysem hervorgerufen werden (36, 38, 75, 81). Aus diesem Grund sprach man auch von der Elastase:Antielastase-Hypothese. Beim Lungenemphysem werden aber auch die nicht-elastischen extrazellulären Fasern geschädigt, wozu keine elastolytischen Enzyme notwendig sind. Daher ist die Bezeichnung Proteinase:Antiproteinase-Hypothese umfassender. Der 1964 zuerst entdeckte genetische Defekt, der zum Lungenemphysem führt, ist der Mangel an α 1-Antitrypsin, einem Inhibitor der Neutrophilen-Elastase, deren Ursache in einer Mutation des hierfür kodierenden Genes liegt (11, 77). Schwieriger ist die Erklärung der Entstehung des weit verbreiteten zigarettenrauch-induzierten Emphysems. Im Rahmen der Erforschung seiner Pathogenese wurden verschiedene Thesen aufgestellt, wie das Gleichgewicht zwischen Proteinasen und Antiproteinasen zugunsten der Proteinasen verschoben werden kann. Pathogenetisch wirksam wird sicher eine Kombination aus ihnen.

Evans und Pryor haben gezeigt, dass Zigarettenrauch einen Methioninrest im aktiven Zentrum des α 1-Antitrypsins oxidiert, und es damit inaktiviert (19). In der im Rahmen einer bronchoalveolären Lavage gewonnenen Flüssigkeit konnte oxidiertes α 1-Antitrypsin nachgewiesen werden (8).

Mit der humanen neutrophilen Elastase wurden viele Versuche durchgeführt. Experimentell gelang hierdurch eine Zerstörung von Lungengewebe (36, 75, 81). Die Übertragung auf das menschliche Emphysem erbrachte jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Einige Studien zeigten eine positive Korrelation zur der neutrophilen Elastase (13), andere eine negative (18). Auch gibt es keine Studien, die einen direkten Zusammenhang zwischen der neutrophilen Elastase und dem zigarettenrauch-induzierten Emphysem beim Menschen herstellen (77).

Elastolytische Enzyme werden von verschiedenen Abwehrzellen freigesetzt. Eine herausragende Rolle besitzen hier die Alveolarmakrophagen. Sowohl unter normalen Umständen als auch im Rahmen einer chronischen Entzündung sind sie die in der Lunge am häufigsten vorkommenden Abwehrzellen (77). Sie kommen auffallend häufig in den Bronchioli respiratorii von Zigarettenrauchern vor, dem Ort, an dem sich ein Lungenemphysem zuerst manifestiert (5).

Eine wichtige Untergruppe von Enzymen mit proteolytischer Aktivität sind die Metalloproteinasen, die sowohl Elastin als auch die verschiedenen Komponenten der Basalmembran angreifen. Sie besitzen außerdem die Fähigkeiten zur Inaktivierung von α 1-Antitrypsin und zur Freisetzung von aktivem Tumornekrosefaktor- α in den Extrazellularraum aus einer inaktiven membrangebundenen Form (77). Die Forschung hat sich lange Zeit auf Abwehrzellen als die Verursacher einer proteolytischen Zerstörung des Lungengewebes konzentriert. Daneben spielen aber auch die in den Alveolarsepten sesshaften Zellen eine Rolle. Zum Beispiel konnten Pneumozyten Typ II dazu angeregt werden, verschiedene Metalloproteinasen zu sezernieren (77).

1.5.2 Tiermodelle in der Erforschung der COPD

Viele der bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Pathogenese der COPD stammen aus der Untersuchung von Tiermodellen, dabei sind jedoch sowohl

deren Möglichkeiten als auch Grenzen zu beachten. Schwierigkeiten in der Etablierung von Tiermodellen ergeben sich zunächst aus der Erkrankung selbst.

Bei der COPD handelt es sich nicht um eine eindeutig zu definierende Erkrankung, vielmehr beschreibt sie einen Symptomkomplex, wobei ihre einzelnen Komponenten von Patient zu Patient variabel ausgeprägt sind (12, 23). Die COPD ist durch das Vorhandensein der Symptome chronischer Husten mit vermehrter Sputumproduktion über einen definierten Zeitraum und einer persistierenden Dyspnoe sowie einer vorhergehenden Exposition mit schädigenden Noxen definiert (68). Die Messung der Symptomintensität wurde in den letzten Jahren ständig verbessert (61), sie wird jedoch vom subjektiven Empfinden des Patienten beeinflusst (21). Objektiver zur Quantifizierung einer Bronchialobstruktion und einer Verminderung der elastischen Rückstellkräfte der Lunge ist die Messung spirometrischer Daten wie des forcierten expiratorischen Volumens (FEV1) (12, 23). Neben der Spirometrie werden bei der Forschung mit Hilfe von Tiermodellen auch morphologische und biochemische Untersuchungen angewandt.

Tiermodelle spielen bei der Erforschung der COPD eine wichtige Rolle, zum einen zur Klärung der pathogenetischen Mechanismen dieser Erkrankung, zum anderen können an Tiermodellen auch neue Therapien erprobt werden (14). Als Modelltiere eignen sich kleine Nager wie Mäuse oder Ratten gut, da diese Spezies gut untersucht sind, ihr Genom sequenziert ist und viele Gemeinsamkeiten mit dem menschlichen besitzt. Diese Tiere sind einfach zu halten und zu züchten. Außerdem haben sie eine hohe Reproduktionsrate. Durch ihre kurze Lebenserwartung können Studien innerhalb weniger Monate abgeschlossen werden (66, 76). Die ersten Tiermodelle wurden durch Exposition mit schädigenden Noxen erzeugt. 1965 beschrieben Gross et al. das erste reproduzierbare Modell eines Emphysems durch Papain-Instillation in die Lungen von Ratten (28). Bis heute wurden viele ähnliche Versuche mit der Instillation verschiedener Proteasen in die Lungen von Versuchstieren durchgeführt. Hierbei entstehen jedoch nur relativ ungenaue Tiermodelle des Zigarettenrauch-induzierten menschlichen Emphysems, da durch die einmalige massive Schädigung durch Instillation einer Noxe nicht der ständige gering aktive

Entzündungsprozess entsteht, den man als Ursache der COPD annimmt (14).

Die Inhalation von Zigarettenrauch gilt als die Hauptursache der COPD. Daher bieten Tiermodelle auf der Basis einer Inhalation von Noxen über einen längeren Zeitraum die größte Ähnlichkeit zur menschlichen Erkrankung (76). Mit Zigarettenrauch-induzierten Tiermodellen lassen sich Veränderungen ähnlich der menschlichen COPD erzeugen, durch eine unterschiedliche Anatomie und Physiologie sind die erhaltenen Veränderungen jedoch nicht in vollem Umfang auf den Menschen übertragbar (98).

Weitere Tiermodelle sind aus der Beobachtung heraus entstanden, dass Mausstämme mit bestimmten Mutationen eine Vergrößerung der Alveolen zeigen, wie sie auch beim menschlichen Emphysem gefunden wird (33, 47, 48). Diese Veränderungen resultieren jedoch eher aus einer gestörten Entwicklung der Lunge (6, 14, 91) als aus einer Zerstörung voll entwickelten Lungengewebes, wie dies bei der COPD der Fall ist (95). Daher dienen solche Modelle mehr zur Erforschung der Entwicklung der Lunge (14) und weniger zur Klärung der Emphysempathogenese.

Durch die gezielte Ausschaltung von Genen in Versuchstieren ist es möglich zu untersuchen, wie sich ein hierdurch entstehender Funktionsverlust des codierten Proteins auswirkt. Wie man solche „Knock-out“-Mutationen in Versuchstiere einschleusen kann, wurde von Majzoub und Muglia beschrieben (45). Auch hier hat die genetische Veränderung jedoch häufig Auswirkungen auf die Entwicklung der Versuchstiere (14, 21, 76). Deshalb wurden Modelle entwickelt, in denen das zu untersuchende Gen gezielt nach Abschluss der Lungenreifung ausgeschaltet werden kann, sogenannte konditionale „Knock-outs“ (29).

2. Ziel der Arbeit

Wie im vorangehenden Kapitel dargestellt, sind Tiermodelle ein wichtiger Baustein in der Erforschung der COPD. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind Teil eines Forschungsprojektes, bei dem die Exposition von männlichen Fischer 344-Ratten mit Stickstoffdioxid als potentielltes Tiermodell evaluiert wurde.

Die symptombasierte Definition eines Tiermodells für die COPD ist schwierig. Deshalb basiert der durchgeführte Versuch auf der Analyse morphologischer Veränderungen. Im Vergleich zur gesunden Lunge sind beim Emphysem morphologische Veränderungen in Form eines Verlustes von Alveolarsepten und einer Vergrößerung der Lufträume innerhalb der Lunge nachweisbar (20, 32, 49, 90). Während die Lungen der Versuchstiere im Rahmen einer anderen Promotion am Lichtmikroskop quantitativ-morphologisch untersucht wurden (99), beschäftigt sich diese Arbeit primär mit der quantitativen Analyse dieser Lungen am Transmissionselektronenmikroskop. Es wird untersucht, ob die NO₂-Exposition zu einer Zerstörung der Alveolarsepten führt, und ob die verschiedenen Anteile der Alveolarsepten in unterschiedlichem Ausmaß betroffen sind. Besondere Berücksichtigung galt dabei der Ultrastruktur des extrazellulären Fasergerüsts.

Zur quantitativen Beurteilung der Alveolarsepten wurden folgende Thesen aufgestellt und überprüft:

- i. Nach 3 Tagen NO₂-Exposition ist das Volumen der Epithelzellen in den Alveolarsepten im Vergleich zur altersgleichen Kontrollgruppe erhöht. Diese Veränderung wird als Ausdruck der durch die NO₂-Exposition induzierten Epithelschädigung interpretiert. Durch Schädigung der Pneumozyten Typ I werden die Pneumozyten Typ II zur Proliferation angeregt.
- ii. Das Volumen der Endothelzellen verändert sich nach 3 Tagen NO₂-Exposition nicht. Das bedeutet, dass die Verbreiterung der Diffusionsbarriere durch Veränderungen in der Epithel- und nicht der Endothelschicht zustande kommt.
- iii. Infolge des bei einem Lungenemphysem auftretenden Septenverlustes nimmt das Gesamtvolumen der Alveolarsepten nach 21 Tagen NO₂-Exposition im Vergleich zur Kontrollgruppe ab.

- iv. Als Zeichen einer chronischen durch die NO₂-Exposition verursachten Schädigung nimmt nach 21 Tagen das interstitielle Volumen zu.
- v. Nach 21 Tagen NO₂-Exposition nimmt die Menge an kollagenen und elastischen Fasern in den Alveolarsepten im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Der Verlust extrazellulärer Fasern gilt als Zeichen eines Lungenemphysems und wird für die verminderte Elastizität emphysematöser Lungen verantwortlich gemacht.
- vi. Nach 21 Tagen NO₂-Exposition ändert sich das Verhältnis der in den Alveolarsepten enthaltenen Kollagen- und Elastinmenge zueinander (Kollagen:Elastin-Ratio).

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Versuchsdurchführung

3.1.1 Stickstoffdioxidexposition der Versuchstiere

Nach Müller (58) gelingt mittels Stickstoffdioxidexposition eine modellhafte Schädigung des Lungenparenchyms. Die vorliegenden Versuche wurden entsprechend einem Expositionsschema von H. Garn (26) mit männlichen Fischer 344-Ratten (Charles River) durchgeführt.

Zu Beginn des Versuches waren die Tiere 6-8 Wochen alt und durchschnittlich 183g schwer (175-194g). Über einen Zeitraum von 3 bzw. 21 Tagen wurden die Tiere in Käfigen (Makrolon Typ IV) zu jeweils zwei bis vier Tieren gehalten und entweder einer mit Stickstoffdioxid (NO_2) versetzten oder einer NO_2 -freien Raumlufatmosphäre ausgesetzt. Zur Exposition wurden die Käfige in gasdichte Plexiglaskammern verbracht, wo für jeweils 23 Stunden täglich ein NO_2 -Partialdruck von 10 ppm aufrechterhalten wurde. Einmal täglich wurde der NO_2 -Partialdruck mit einem NO_2 -empfindlichen elektrochemischen Element kontrolliert (ECS 102-; MPSensor Systems, München) (26, 58). Die Tiere der Kontrollgruppe wurden ebenfalls in gasdichte Plexiglaskammern verbracht, jedoch durchgehend mit normaler Raumlufat versorgt. Während des gesamten Versuchszeitraumes hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Wasser.

Folgende Versuchsgruppen wurden in die Untersuchung einbezogen:

	Exposition	
Expositionsdauer	Raumlufat	NO_2
3 Tage	n = 4	n = 6
21 Tage	n = 7	n = 6

Tab. 3.1.1: Verteilung der Tiere auf die verschiedenen Versuchsgruppen, n bezeichnet die Anzahl der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen

Zu Versuchsbeginn hatten alle Tiere dasselbe Alter. Sie waren zum Versuchszeitpunkt noch nicht ausgewachsen. Um Wachstumseffekte von

expositionsbedingten zu unterscheiden, wurde zur jeweiligen NO₂-exponierten Versuchsgruppe eine altersgleiche unter Raumluft gehaltene Kontrollgruppe in den Versuch einbezogen. Dies ermöglichte bei der Versuchsauswertung den Vergleich zwischen jeweils altersgleichen Tieren.

3.1.2 Organentnahme und Fixierung

Die Entnahme der Lungen erfolgte jeweils am Ende der individuellen Versuchszeit. Zunächst wurden die Tiere mit ≥ 50 mg Narcoren (= Pentobarbital) intraperitoneal anästhesiert. Nach der Bestimmung des Körpergewichtes wurde in tiefer Narkose das Abdomen eröffnet. Die Tiere wurden durch Eröffnung der Milzgefäße ausgeblutet. Danach wurde eine Kanüle für die Instillationsfixierung in die Trachea eingeführt. Als nächstes wurde das Diaphragma perforiert, woraufhin die Lunge kollabierte. Dies ermöglichte das Eröffnen des Thorax und die Entnahme der Lunge, ohne die Pleura zu verletzen.

Sofort nach Entnahme wurden die Organe mit einer 4%-igen PFA/PBS-Lösung (Paraformaldehyd/Phosphatpuffer) bei einem Druck von 20 cm Wassersäule über die eingebrachte Kanüle für 20 bis 30 Minuten instillationsfixiert. Nach Ligatur der Trachea wurden die Lungen mindestens über Nacht in demselben Fixativ (4% PFA/PBS) gelagert.

3.1.3 Probengewinnung

Um eine repräsentative Auswahl der Proben für die elektronenmikroskopische Auswertung zu treffen, wurde ein stereologisches Verfahren, das „Systematic Uniform Random Sampling“ (27) angewendet. Hierfür wurden zunächst die Gesamtvolumina der fixierten Lungen mittels Flüssigkeitsverdrängung nach Scherle (73) ermittelt. Dieses auf dem archimedischen Prinzip beruhende Verfahren ermöglicht die Volumenbestimmung irregulär geformter Körper.

Nach Bestimmung der Gesamtvolumina wurden die Lungen in Scheiben gleicher Dicke zerlegt. Um die hierfür notwendige Stabilität zu erzielen, wurden die Lungen zunächst in zweiprozentiges wässriges Agar-Agar eingebettet. Dieser wurde in Wasser ausgekocht, wobei er sich verflüssigte. Nach dem Auskochen wurde der Agar-Agar abgekühlt. Die Lungen wurden kurz vor dem Zeitpunkt des Wiedererstarrens in den Agar-Agar eingebracht und für 2 bis 3 Stunden gekühlt. Damit waren sie für die weiteren Arbeitsschritte vorbereitet.

Die in dem verfestigten Agar-Agar befindlichen Lungen konnten nun in 3mm dicke Scheiben geschnitten werden, wobei die Position des ersten Schnittes zufällig war. Die so erhaltenen Scheiben wurden von kranial nach kaudal sortiert, und zwar alle mit jeweils der kranialen Schnittfläche nach oben. Jede dritte Scheibe wurde für die elektronenmikroskopische Auswertung herangezogen, wobei die erste hierfür ausgewählte Scheibe zufällig bestimmt wurde. Die nun noch verbliebenen Scheiben wurden mit der kranialen Fläche nach oben zufällig auf ein Schnittbrettchen verteilt und mit einem durchsichtigen regelmäßigen Punkteraster bedeckt. Bei einem Abstand von 5mm repräsentierte jeder Punkt eine Fläche von $0,25\text{cm}^2$. Es wurden von denjenigen Orten aus den Lungenscheiben Proben genommen, über die ein Punkt des Rasters zu liegen kam. Diese ungefähr würfelförmigen Gewebelöckchen mit einer Kantenlänge von circa 4mm wurden für die elektronenmikroskopische Auswertung weiter aufgearbeitet.

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben in einem Fixans bestehend aus 1% GA (Glutaraldehyd), 1% Paraformaldehyd PFA (Paraformaldehyd) und 0,1M Na-Cacodylat bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt.

3.1.4 Probenaufbereitung

Die Aufarbeitung der Proben für die elektronenmikroskopische Auswertung wurde wie folgt durchgeführt:

Zunächst wurden diese 4-mal für jeweils 5 Minuten in 0,1M gepufferten Na-Cacodylat gewaschen. Danach erfolgte eine zweistündige Postfixierung mit 1% OsO_4 (Osmiumtetroxid) in 0,1M gepuffertem Na-Cacodylat. Nun wurden die Proben erneut 4-mal für jeweils 5 Minuten in 0,1M gepufferten Na-Cacodylat, dann 2-mal für jeweils 5 Minuten in Aqua bidest gewaschen und für circa 1 Stunde gelagert. Die darauf folgende Blockkontrastierung mit 4%igem wässrigem Tannin (pH 7) erfolgte über Nacht. Tannin dient zur Kontrastverstärkung durch Anlagerung von Gerbstoffen an elastische und kollagene Fasern.

Nach erneutem 4-maligen Waschen und einstündiger Aufbewahrung in Aqua bidest wurde wiederum über Nacht die Blockkontrastierung mit halbgesättigtem, wässrigem Uranylacetat durchgeführt. Dabei lagerten sich Schwermetallsalze besonders an Phospholipide an. Das verhinderte ein Auswaschen und verstärkte

somit den Kontrast. Hiernach wurden die Proben weitere 4-mal für jeweils 5 Minuten mit Aqua bidest gewaschen.

Anschließend wurden die Proben entwässert und eingebettet. Dazu wurden sie je 2-mal für 10 Minuten in Aceton mit aufsteigender Konzentration (70%, 90%, 100%) verbracht. Danach kamen die Proben für eine Stunde in ein 1:1-Gemisch von Aceton und Araldit. Araldit ist ein flüssiges, monomeres Kunstharz. Nun wurden die Proben über 10-15 min im Exsikkator bei einem Druck von 300 mbar entgast. Nach Aufbewahrung über Nacht in Araldit wurden sie in frisches Araldit überführt. Anschließend wurden die Proben zur Polymerisation und damit Verfestigung des Araldits auf +60°C erhitzt.

Von den so aufbereiteten Proben wurden zunächst 1µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Diese wurden nach Richardson gefärbt. Lichtmikroskopisch wurden geeignete Lokalisationen mit viel Lungenparenchym für die elektronenmikroskopische Auswertung identifiziert, von denen dann Ultradünnschnitte mit einer Dicke von circa 90nm angefertigt wurden. Die Ultradünnschnitte wurden auf Nickelnetze (Durchmesser 3,05mm 300 Mesh) aufgebracht, die dann am Transmissionselektronenmikroskop analysiert wurden.

3.2 Versuchsauswertung

3.2.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Beurteilung der Proben erfolgte zunächst lichtmikroskopisch an Paraffinschnitten. Es wurden zwei spezielle histochemische Färbungen verwendet, um die Hauptkomponenten des extrazellulären Fasergerüsts, Elastin (Miller's Elastin-Färbung [97]) und Kollagen (Sirius Rot [37]), darzustellen. Außerdem wurden die Alveolengröße und Hinweise auf Entzündungszeichen berücksichtigt.

3.2.2 Vorbereitung der elektronenmikroskopischen Auswertung

Von den für die elektronenmikroskopische Auswertung bestimmten Gewebelöckchen wurden ebenfalls Dünnschnitte für die Betrachtung am Lichtmikroskop angefertigt. Diese dienten zur Ermittlung des Gesamtvolumens der Alveolarsepten. Dieser Wert wurde benötigt, um die absoluten Volumina der

einzelnen Bestandteile der Alveolarsepten aus den mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bestimmten relativen Volumina zu berechnen.

G. Zimmermann beschreibt in seiner Dissertation, die sich mit quantitativen lichtmikroskopischen Untersuchungen an denselben Lungen befasst, das Verfahren, welches zur Bestimmung des septalen Volumens diente (99). In seiner Arbeit erfolgte die Auswertung nach Übertragung auf einen Computermonitor mit einer speziell für stereologische Anwendungen konzipierten Software (C.A.S.T. Grid, Version 2.0, Olympus, Albertslund, Dänemark). Über das Bild des Lungenparenchyms wurde ein Punkteraster projiziert. Die Anzahl der Schnittpunkte von Alveolarsepten und Raster war ein Maß für deren Volumenanteil an der gesamten Lunge. Das absolute Volumen der Alveolarsepten konnte dann mit Hilfe der zu Beginn bestimmten absoluten Lungenvolumina berechnet werden (99).

3.2.3 Datenanalyse

Die Auswertung erfolgte nach dem von P. Gehr beschriebenen stereologischen Verfahren (27). Ziel der Stereologie ist es, anhand zweidimensionaler Proben quantitative Aussagen über den dreidimensionalen Aufbau von Objekten zu machen. Mit Hilfe der Stereologie sind Aussagen über z.B. den quantitativen Beitrag einer Strukturkomponente zum Gesamtvolumen eines Objektes möglich. Hierzu wird die Volumendichte einer Komponente bestimmt, d.h. der relative Volumenanteil am Gesamtorganvolumen.

Um das absolute Volumen der Komponente bestimmen zu können, muss das Volumen des Referenzraumes bekannt sein. Hierbei handelt es sich i.d.R. um das gesamte zu untersuchende Objekt, in diesem Fall also die Lunge, deren absolutes Volumen durch die Flüssigkeitsverdrängung bestimmt wurde. An zufällig ausgewählten Proben der Lungen wurden mittels Punktzählung die Flächenanteile, die die verschiedenen Gewebekomponenten einnehmen, bestimmt. Hierzu wurde ein Punktraster dem jeweiligen Schnitt überlagert und gezählt, wie viele Punkte die verschiedenen Gewebekomponenten überlagern. Die so bestimmten Flächen entsprechen gemäß dem schon 1847 von Delesse formulierten Prinzip, den relativen Volumenanteilen der einzelnen Komponenten am Gesamtorgan. Unter Kenntnis des Gesamtvolumens ließen sich dann die absoluten Volumina der verschiedenen Komponenten berechnen.

Die Bestimmung der absoluten Volumina der einzelnen Strukturen innerhalb der Alveolarsepten erforderte ein schrittweises Vorgehen. Zunächst wurde das Volumen der gesamten Lunge mit Hilfe der Wasserverdrängung bestimmt. In den nächsten Schritten wurde lichtmikroskopisch der Anteil von Parenchym (Ductus alveolares, Alveolarräume, Alveolarsepten) und nicht parenchymatösen Strukturen (Bronchien und Gefäße, Pleura) bestimmt. Bei 4400-facher Ausgangsvergrößerung am Elektronenmikroskop (entspricht einer circa 60.000-fachen Vergrößerung an dem zur Auswertung verwendeten Monitor) wurde die Zusammensetzung des Parenchyms aus Gasräumen, Alveolarseptengewebe und Kapillarlumen ermittelt. Danach erfolgte die Quantifizierung der Zusammensetzung des Alveolarseptengewebes auf elektronenmikroskopischer Ebene.

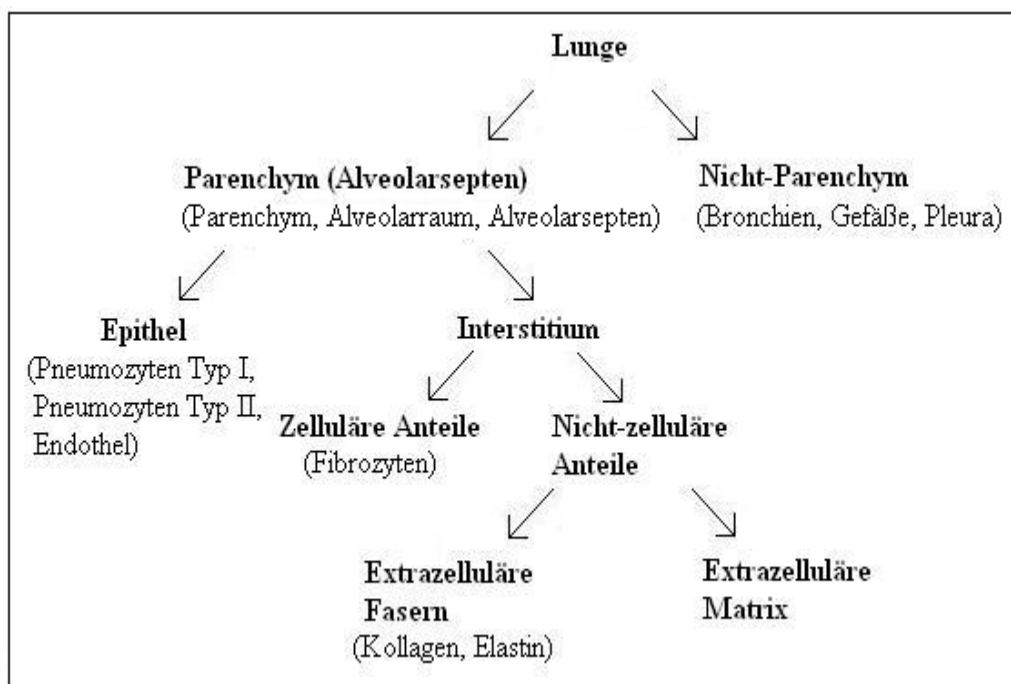


Abb. 3.2.3: Schematische Einteilung der verschiedenen in der Lunge enthaltenen Gewebetypen

Mit Hilfe der so erstellten Daten-Kaskade konnten dann die Volumina der einzelnen Anteile der Alveolarsepten berechnet werden.

3.2.4 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die transmissionselektronenmikroskopische Auswertung wurde an einem Zeiss EM 900 vorgenommen. Bei dieser Auswertung wurden die relativen Volumina der zellulären bzw. extrazellulären Komponenten der alveolären Septen bestimmt. Im Detail waren dies Alveolarepithel, Kapillarendothel und Interstitium gesamt. Innerhalb des Interstitiums wurden die relativen Volumina der extrazellulären Fasern Kollagen und Elastin gesondert bestimmt.

Zur quantitativen Auswertung wurden Bildausschnitte aus jedem Präparat herangezogen. Die Netzstruktur der Objektträger bot eine einfache Möglichkeit, Bildausschnitte in fest definierten Abständen auszuwählen. Fiel auf einen so ausgewählten Ausschnitt nicht parenchymatöses Gewebe, wurde dieser übersprungen.

Am Mikroskop wurde eine 4400-fache Ausgangsvergrößerung gewählt. Die Endvergrößerung auf dem Monitor wurde mit Hilfe eines Kalibrierungsrasters auf 60632x bestimmt. Auf diesen Monitor wurde ein Punkteraster der Größe A3 mit 10x14 Punkten geklebt. Der Punkteabstand betrug senkrecht sowie waagerecht jeweils 29 mm, dies entspricht 0,48 μm im Originalpräparat. Nun konnte bestimmt werden, wie viele Punkte auf die einzelnen Komponenten der Alveolarsepten entfallen und daraus die relativen Volumina (Volumendichten, V_v) berechnet werden.

3.2.5 Berechnung der Volumina der septalen Strukturen

Die Volumina der einzelnen Strukturen innerhalb der Alveolarsepten wurden aus den zuvor ermittelten Volumina am Lichtmikroskop und am Elektronenmikroskop ausgezählten Punktmengen mit folgenden Formeln berechnet:

Berechnung des septalen Volumens:

Das Gesamtvolumen der Alveolarsepten $V(\text{Sept})$ ergibt sich aus dem Produkt der relativen Volumina der Alveolarsepten $V_v(\text{Sept}, \text{Par})$ sowie des gesamten Lungenparenchyms $V_v(\text{Par}, \text{Lunge})$ mit dem absoluten Volumen der kompletten Lunge $V(\text{Lunge})$. Die Volumendichten errechnen sich aus den am Monitor ausgezählten Testpunkten, die auf das zu untersuchende Gewebe fallen. $V_v(\text{Sept},$

Par) ist der Quotient aus den auf die Septen entfallenden Punkten $P(\text{Sept})_{\text{LiMi}}$ und den Punkten, die über Lungenparenchym jeglicher Art liegen $P(\text{Par})_{\text{LiMi}}$. Der Zusatz LiMi kennzeichnet das zugrundeliegende lichtmikroskopische Verfahren.

$$\begin{aligned} V(\text{Sept}) &= V_v(\text{Sept}, \text{Par}) \times V_v(\text{Par}, \text{Lunge}) \times V(\text{Lunge}) \\ &= [P(\text{Sept})_{\text{LiMi}} : P(\text{Par})_{\text{LiMi}}] \times [P(\text{Par})_{\text{LiMi}} : P(\text{Lunge})_{\text{LiMi}}] \times V(\text{Lunge}) \end{aligned}$$

Berechnung der Volumina von Epithel, Endothel und septalem Interstitium:

Das Gesamtvolumen der Epithelzellen $V(\text{Epi})$ wird als Produkt aus dem relativen Anteil des Epithels am Septenvolumen, $V_v(\text{Epi}, \text{Sept})$, multipliziert mit dem absoluten septalen Volumen, $V(\text{Sept})$, ermittelt. $V_v(\text{Epi}, \text{Sept})$ wurde wiederum über Punktauszählung bestimmt, jedoch am Elektronenmikroskop, daher der Zusatz ElMi. $P(\text{Sept})$ steht hierbei für alle auf ein Alveolarseptum fallenden Punkte und $P(\text{Epi})$ für die Punkte auf Epithelzellen.

$$\begin{aligned} V(\text{Epi}) &= V_v(\text{Epi}, \text{Sept}) \times V_v(\text{Sept}, \text{Par}) \times V_v(\text{Par}, \text{Lunge}) \times V(\text{Lunge}) \\ &= [P(\text{Epi})_{\text{ElMi}} : P(\text{Sept})_{\text{ElMi}}] \times [P(\text{Sept})_{\text{LiMi}} : P(\text{Par})_{\text{LiMi}}] \times \\ &\quad [P(\text{Par})_{\text{LiMi}} : P(\text{Lunge})_{\text{LiMi}}] \times V(\text{Lunge}) \\ &= [P(\text{Epi})_{\text{ElMi}} : P(\text{Sept})_{\text{ElMi}}] \times V(\text{Sept}) \end{aligned}$$

Die Bestimmung des endothelialen Volumens $V(\text{Endo})$ und des interstitiellen Volumens $V(\text{Int})$ erfolgte analog.

Berechnung der Volumina von Kollagen und Elastin:

Kollagen ist ein Bestandteil des interstitiellen Raumes. Aus diesem Grund wurde für die Bestimmung des Kollagenvolumens $V(\text{Koll})$ das Volumen des Interstitiums mit dem relativen Kollagenvolumen $V_v(\text{Koll}, \text{Int})$ multipliziert. Das Volumen des Interstitiums ist das Produkt aus dessen relativem Volumen $V_v(\text{Int}, \text{Sept})$ bezogen auf die Alveolarsepten und dem Gesamtvolumen der Alveolarsepten. $V_v(\text{Koll}, \text{Int})$ wurde ebenfalls über Punktzählung ermittelt und ergab sich aus dem Quotienten der auf Kollagen entfallenden Punkte $P(\text{Koll})$ und den auf das gesamte Interstitium entfallenden Punkte $P(\text{Int})$.

$$\begin{aligned}
 V(\text{Koll}) &= V_v(\text{Koll}, \text{Int}) \times V_v(\text{Int}, \text{Sept}) \times V_v(\text{Sept}, \text{Par}) \times V_v(\text{Par}, \text{Lunge}) \times V(\text{Lunge}) \\
 &= [P(\text{Koll})_{\text{EIMi}} : P(\text{Int})_{\text{EIMi}}] \times [P(\text{Int})_{\text{EIMi}} : P(\text{Sept})_{\text{EIMi}}] \times [P(\text{Sept})_{\text{LiMi}} : P(\text{Par})_{\text{LiMi}}] \times V(\text{Lunge}) \\
 &= P(\text{Koll})_{\text{EIMi}} : P(\text{Int})_{\text{EIMi}}] \times [P(\text{Int})_{\text{EIMi}} : P(\text{Sept})_{\text{EIMi}}] \times V(\text{Sept}) \\
 &= [P(\text{Koll})_{\text{EIMi}} : P(\text{Sept})_{\text{EIMi}}] \times V(\text{Sept})
 \end{aligned}$$

Das Elastinvolumen $V(\text{Elas})$ wurde auf die gleiche Weise berechnet. Auch hier gilt die Voraussetzung, dass das Elastin ein Bestandteil des interstitiellen Raumes ist.

Von den elektronenmikroskopischen Präparaten wurden außerdem elektronenoptische Aufnahmen angefertigt, deren Endvergrößerung sich mit Hilfe des Kalibrierungsrasters auf 9287-fach bei einer 4400-fachen Ausgangsvergrößerung bestimmen ließ.

3.2.6 Normierung der Volumina auf das Körpergewicht

Um den Effekt eines unterschiedlichen Körpergewichtes auf das Lungenvolumen und das Volumen der einzelnen Kompartimente der Lunge zu berücksichtigen, wurden neben den absoluten Volumina die auf das Körpergewicht normierten Werte berechnet. Hierzu wurden die errechneten absoluten Volumina durch das Körpergewicht (in kg) dividiert.

3.3 Statistik

Sämtliche statistische Berechnungen wurden mit dem Programm SigmaStat 3.1 durchgeführt, wobei alle Daten als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung angegeben wurden.

Die Einteilung der Versuchstiere in die vier Expositionsgruppen zu Versuchsbeginn erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Zum Vergleich der Körpergewichte der Tiere diente der One-Way-ANOVA-Test.

Bei der Bestimmung der Körpergewichte zu Versuchsende sowie der Prüfung aller aufgestellten Thesen wurden jeweils nur die beiden altersgleichen Gruppen miteinander verglichen, die einer unterschiedlichen Exposition unterzogen

worden waren. Aus diesem Grund erfolgten diese statistischen Untersuchungen mit dem t-Test für unverbundene Stichproben.

Die im Abschnitt Resultate abgebildeten Graphiken wurden mit dem Programm SigmaPlot 10.0 erstellt.

4. Resultate

4.1 Qualitative lichtmikroskopische Beurteilung

Aus den verschiedenen Versuchsgruppen (Raumluft für je 3 und 21 Tage, Raumluft mit 10 ppm NO₂ für je 3 und 21 Tage) wurden Dünnschnitte mit einer speziellen Elastin- (Miller's Elastinfärbung) bzw. Kollagenfärbung (Sirius Rot) angefertigt. Die Präparate wurden nach Unterschieden in der Parenchymstruktur sowie hinsichtlich der Menge und Verteilung der extrazellulären Fasern Elastin und Kollagen durchmustert.

Im Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe fand sich bei den NO₂-Expositionsgruppen sowohl nach 3 als auch nach 21 Tagen eine qualitativ identische Parenchymstruktur. Eine Septumverdickung als Hinweis auf ein Ödem war nicht zu beobachten. Unterschiede in der Menge und Verteilung der Elastin- und Kollagenfasern fielen nicht auf.

Beim Vergleich der Präparate aus den dreitägigen Expositionen fiel eine erhöhte Zahl von Alveolarmakrophagen in der NO₂-Expositionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe auf. Diese befanden sich hauptsächlich am Übergang der Bronchioli terminales zu den Ductus alveolares.

Weiterhin zeigte sich nach 21 Tagen in der NO₂-Expositionsgruppe subpleural eine leicht erhöhte Alveolenweite im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.2 Versuchsgruppen

Im Rahmen des Versuches wurden insgesamt 23 Tiere untersucht. Jeweils 6 Tiere wurden in den Expositionsgruppen über 3 bzw. 21 Tage NO₂-exponiert. Die Raumluft-Kontrollgruppen umfassten 4 Tiere in der 3-tägigen Exposition und 7 Tiere in der Exposition über 21 Tage.

4.3 Körpergewicht

Zunächst wurde das Körpergewicht der Tiere vor Versuchsbeginn bestimmt. Hierbei wurden folgende Werte (in kg Körpergewicht) ermittelt:

	Expositionsgruppe	
Versuchsdauer	Raumluft	NO ₂
3 Tage	0,177±0,001	0,190±0,007*
21 Tage	0,177±0,002	0,187±0,001*

Tab. 4.3a: Körpergewicht in kg zu Versuchsbeginn; signifikant ($p < 0,001$) höheres Körpergewicht in den NO₂-Expositionsgruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (*)

Der Vergleich des Körpergewichts der Versuchstiere ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) mit einem höheren Körpergewicht in den NO₂-Expositionsgruppen.

Die absoluten Körpergewichte (in kg) der Tiere am Ende des individuellen Versuchszeitraumes waren:

	Expositionsgruppe	
Versuchsdauer	Raumluft	NO ₂
3 Tage	0,210±0,003	0,189±0,009*
21 Tage	0,251±0,013	0,212±0,026*

Tab. 4.3b: Körpergewicht in kg zum Ende des jeweiligen Versuchszeitraumes; signifikant ($p < 0,05$) geringeres Körpergewicht in den NO₂-Expositionsgruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (*)

Um die Entwicklung des Körpergewichtes der Tiere vergleichen zu können, wurden die relativen Gewichte berechnet. Das Ausgangsgewicht vor Versuchsbeginn wurde dabei auf 100% gesetzt.

Die Berechnung der relativen Körpergewichte zum Ende der jeweiligen Expositionszeit ergab folgende Werte (in %):

Versuchsdauer	Expositionsgruppe	
	Raumluf	NO ₂
3 Tage	118±1,73*	100±4,40
21 Tage	139±3,90*	110±5,02

Tab. 4.3c: relatives Körpergewicht zum Versuchsende in % bezogen auf das mittlere Ausgangsgewicht der jeweiligen Versuchsgruppe; unter Raumluf signifikant höheres Körpergewicht als unter NO₂-Exposition ($p<0,05$), sowohl nach 3 als auch nach 21 Tagen, gekennzeichnet durch *

Es zeigte sich eine Gewichtszunahme der Tiere im Versuchsverlauf (3 Tage im Vergleich zu 21 Tagen), sowohl in der Kontroll- als auch in der Expositionsgruppe. Da der Versuch so konzipiert war, dass beiden Expositionsgruppen (3 Tage bzw. 21 Tage NO₂) altersgleiche Kontrollgruppen gegenüberstanden, konnten auch die von der Versuchsdauer abhängigen Effekte deutlich gemacht werden.

Die relativen Werte ermöglichten einen Vergleich zwischen den Effekten einer Exposition mit NO₂ bzw. Raumluf. Die Gewichtsunterschiede zwischen den Versuchs- und den jeweiligen Kontrollgruppen sind signifikant ($p<0,05$), wobei das Körpergewicht unter NO₂-Exposition weniger stark zugenommen hatte als unter Raumluf. Dies war in der Interpretation der Versuchsergebnisse zu berücksichtigen, und die weiteren während des Versuches erhobenen Daten wurden daher als absolute Werte sowie auf das Körpergewicht bezogen ermittelt.

4.4 Lungenvolumina

Im Rahmen des Versuches wurden die Volumina der fixierten Lungen der einzelnen Tiere nach der Organentnahme bestimmt. Hierbei wurden folgende Werte ermittelt:

	Expositionsgruppe	
Versuchsdauer	Raumluft	NO ₂
3 Tage	4920±549	4768±592
21 Tage	5496±435	7623±514*

Tab. 4.4.1: Lungenvolumen in mm³ in Abhängigkeit von der Versuchsdauer und der Expositionsgruppe; * kennzeichnet einen signifikanten ($p < 0,001$) Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe

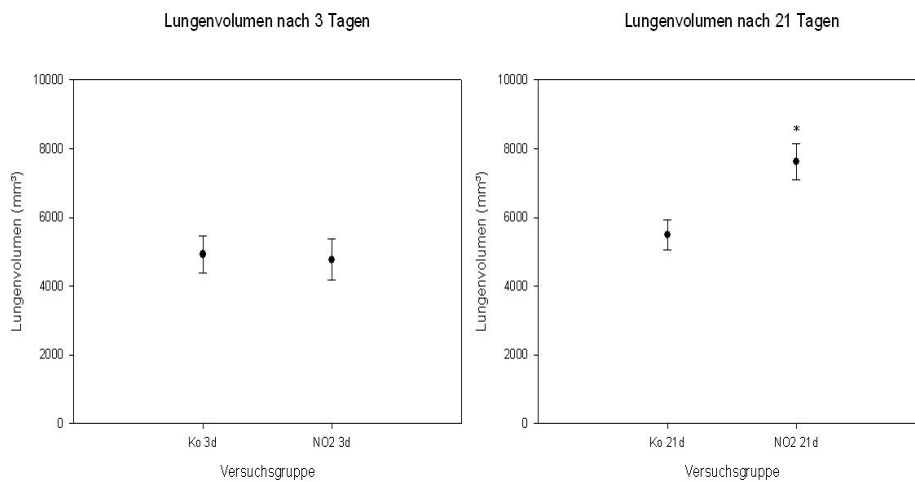


Abb. 4.4: Lungenvolumina in mm³ nach 3 und 21 Tagen in Abhängigkeit von der Expositionsgruppe. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet durch * ($p < 0,001$).

Das Lungenvolumen nach 3 Tagen ist in beiden Gruppen nahezu gleich. Nach 21 Tagen weist die NO₂-Expositionsgruppe hingegen ein signifikant höheres Lungenvolumen auf ($p < 0,001$).

Bezogen auf das Körpergewicht ergaben sich folgende Werte:

	Expositionsgruppe	
Versuchsdauer	Raumluft	NO ₂
3 Tage	23468±2482	24569±1988
21 Tage	21956±2231	37736±3977*

Tab. 4.4.2: Lungenvolumen/Körpergewicht in mm³/kg in Abhängigkeit von der Versuchsdauer sowie der Expositionsgruppe; * kennzeichnet einen signifikanten ($p < 0,001$) Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe

Das auf das Körpergewicht bezogene Lungenvolumen zeigt wie bei den absoluten Werten keinen Unterschied nach 3 Tagen. Nach 21 Tagen besteht in der Expositionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant ($p < 0,001$) höherer Wert.

4.5 Elektronenmikroskopie

4.5.1 Qualitative Beurteilung der Ultradünnschnitte am Elektronenmikroskop

Von den mittels des beschriebenen Verfahrens des *Systematic Uniform Random Sampling* gewonnenen Gewebeblöckchen wurden Ultradünnschnitte gefertigt. Diese wurden am Elektronenmikroskop durchmustert. Abb. 4.5.1a zeigt einen Ausschnitt aus einem Alveolarseptum mit Benennung der darin enthaltenen Strukturen.



Abb. 4.5.1a: Alveolarseptum F43/02/2, NO₂-Expositionsgruppe 21 Tage, Ausgangsvergrößerung 4400x, Ausschnitt aus einem Alveolarseptum
Dargestellt sind die verschiedenen Strukturen, die unterschieden und in die quantitative Auswertung einbezogen wurden: Pn I = Pneumozyt Typ I, Pn II = Pneumozyt Typ II, Endo = Endothel, Kap = Kapillarlumen (hier mit Erythrozyt, nicht quantitativ erfasst), Int = Interstitium, Koll = Kollagen, Elas = Elastin.

Bei der Durchmusterung der Präparate fielen Unterschiede zwischen den Kontroll- und NO₂-Expositionsgruppen auf. Nach 3-tägiger Versuchsdauer war in den NO₂-Expositionsgruppen die Anzahl der Alveolarmakrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. In Abb. 4.5.1b ist ein Alveolarmakrophage dargestellt, der gerade durch eine Kohnsche Pore von einer Alveole in eine andere übertritt.

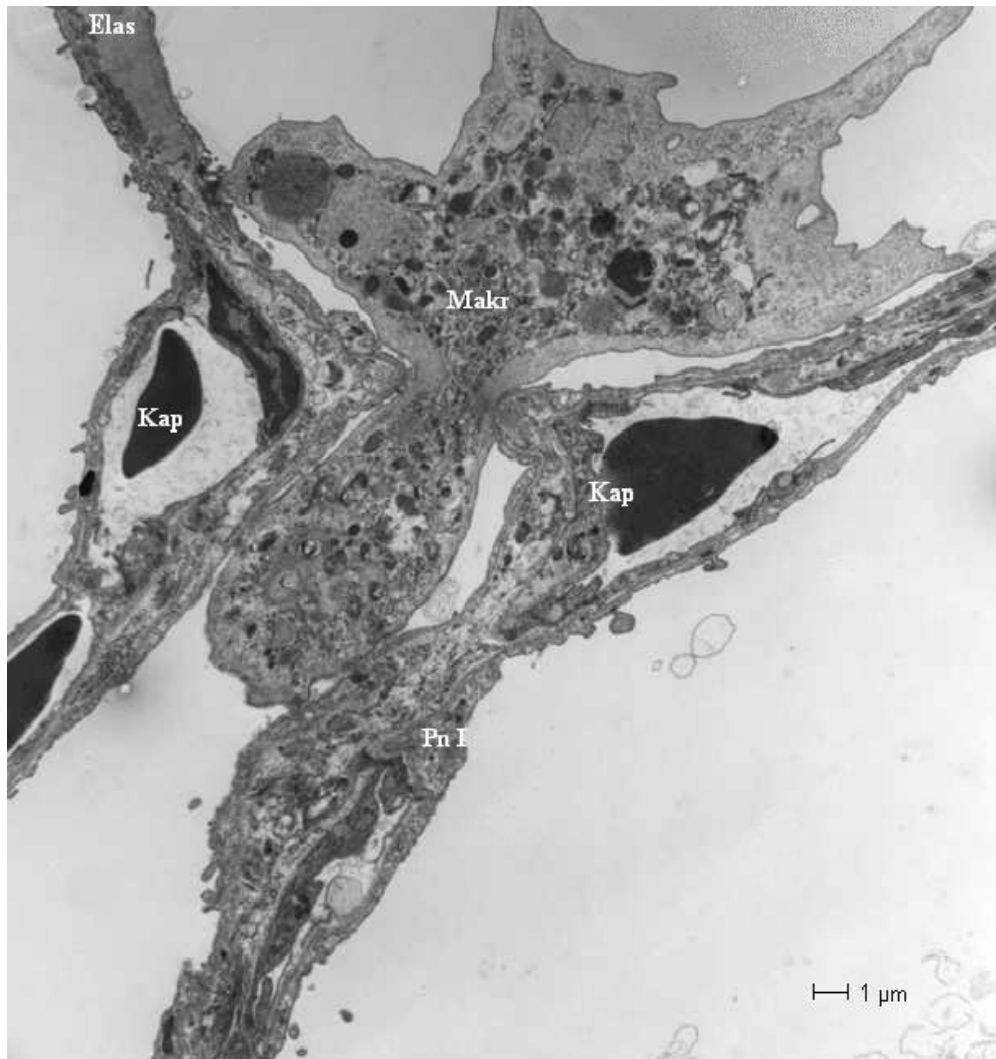


Abb. 4.5.1b: Alveolarmakrophage F4/03/1, NO₂-Expositionsgruppe 3 Tage, Ausgangsvergrößerung 3000x, Alveolarmakrophage in Kohnscher Pore nach 3 Tagen NO₂-Exposition

In der Expositionsgruppe wurden nach 3 Tagen NO₂-Exposition gehäuft Alveolarmakrophagen beobachtet.

(Makr = Makrophage, Pn I = Pneumozyt Typ I, Kap = Kapillare, Elas = Elastin)

In der NO₂-Expositionsgruppe war die Diffusionsbarriere infolge einer Verdickung der Epithelschicht aus Pneumozyten Typ I sowie einer Vermehrung der Anzahl der Pneumozyten Typ II verdickt. Abb. 4.5.1c zeigt einen Pneumozyten Typ II, der eine große Alveolaroberfläche bedeckt. Die Diffusionsstrecke zwischen Alveolarraum und Kapillaren ist durch die verdickte Epithelschicht verlängert.

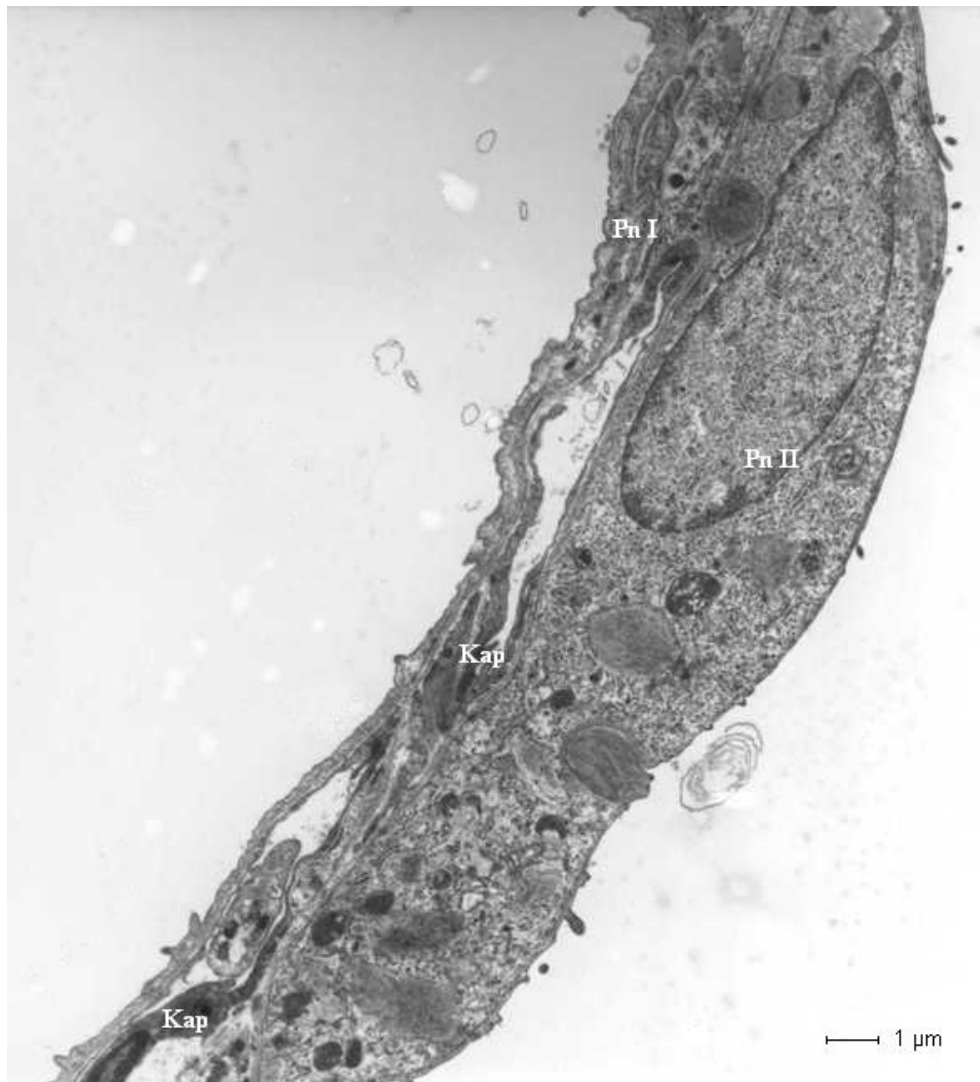


Abb. 4.5.1c: Alveolarseptum F6/03/1, NO₂-Expositionsgruppe 3d, Ausgangsvergrößerung 4400x, Ausschnitt aus einem Alveolarseptum nach 3 Tagen NO₂-Exposition

Auffallend ist ein Pneumozyt Typ II, der eine große Fläche des Alveolarseptums bedeckt, hierdurch wird die Diffusionsstrecke zu den Kapillaren erhöht (Pn I = Pneumozyt Typ I, Pn II = Pneumozyt Typ II, Kap = Kapillare)

Nach einer Versuchsdauer von 21 Tagen erschienen die alveolären Lufträume in der NO₂-Expositionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe vergrößert.

4.5.2 Quantitative Analyse der Ultrastruktur der Alveolarsepten

4.5.2.1 Zu überprüfende Thesen

Im Vergleich zur gesunden Lunge sind beim Emphysem morphologische Veränderungen in Form eines Verlustes von Alveolarsepten und einer Vergrößerung der Lufträume innerhalb der Lunge nachweisbar (20, 32, 49, 90). Unter Berücksichtigung der Ultrastruktur der Alveolarsepten als Schwerpunkt der Arbeit wurden die eingangs aufgestellten Thesen überprüft.

4.5.2.2 Überprüfung der aufgestellten Thesen

Die quantitativ-morphologischen Analysen zur Überprüfung der einzelnen Thesen erbrachten folgende Ergebnisse:

- i. Nach 3 Tagen NO₂-Exposition ist das Volumen der Epithelzellen in den Alveolarsepten im Vergleich zur altersgleichen Kontrollgruppe erhöht.*

Zur Beantwortung der Frage, ob sich nach 3 Tagen NO₂-Exposition das Volumen der Epithelzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, wurde dieses in der Versuchsgruppe, die 3 Tage NO₂-exponiert war, bestimmt und mit dem der 3-Tage-Kontrollgruppe verglichen. Es wurden wiederum neben den absoluten die auf das Körpergewicht bezogenen Werte ermittelt.

Folgende Werte wurden ermittelt:

	Expositionsgruppe	
	Raumluft(3Tage)	NO ₂ (3 Tage)
V(Epi) (mm ³)	153±33	294±42*
V(Epi)/kgKG(mm ³ /kg)	731±154	1555±208*

Tab. 4.5.2.2.i: Epithelvolumen und Epithelvolumen pro Körpergewicht nach 3 Tagen in Abhängigkeit von der Exposition; angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung; signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet durch * (p<0,001)

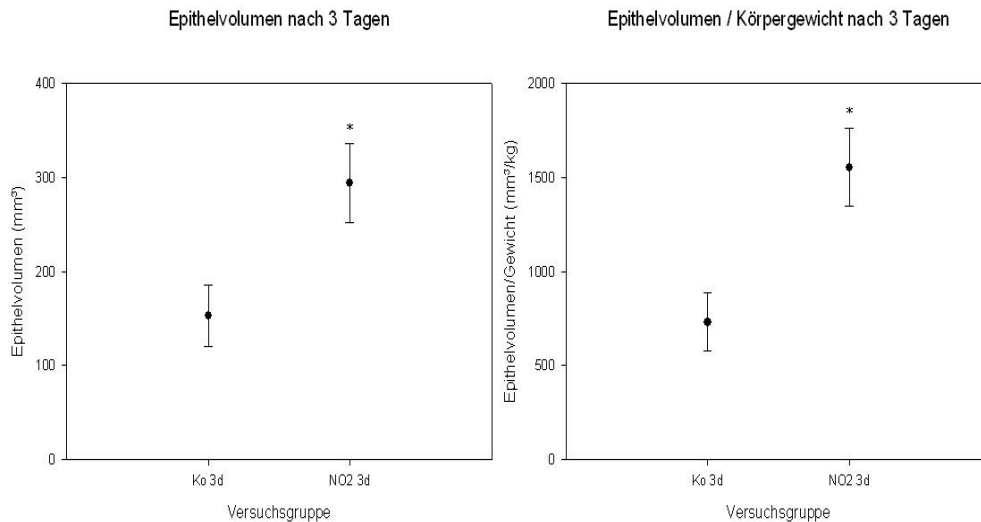


Abb. 4.5.2.2i: Septales Epithelvolumen nach 3 Tagen Versuchsdauer in Abhängigkeit von der Exposition (Raumluft oder NO₂); dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe sind gekennzeichnet durch * ($p < 0,001$)

ii. *Das Volumen der Endothelzellen ändert sich nach 3 Tagen NO₂-Exposition nicht.*

Zur Prüfung dieser These wurden die Volumina der Endothelzellen nach einer Versuchsdauer von 3 Tagen berechnet und die Werte unter NO₂-Exposition mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

Es wurden die folgenden Werte berechnet:

	Expositionsgruppe	
	Raumluft(3Tage)	NO ₂ (3 Tage)
V(Endo) (mm ³)	88 \pm 19	84 \pm 15
V(Endo)/kgKG(mm ³ /kg)	468 \pm 120	402 \pm 70

Tab. 4.5.2.2ii: Endotheliales Volumen absolut und auf das Körpergewicht bezogen nach 3 Tagen Versuchsdauer; angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant.

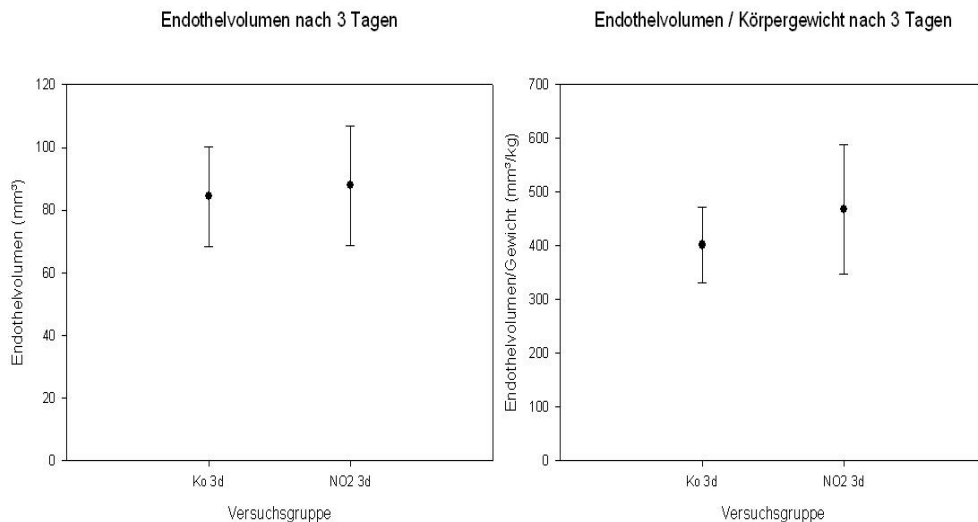


Abb. 4.5.2.2ii: Endothelvolumen und Endothelvolumen/Körpergewicht nach 3 Tagen NO₂-Exposition im Vergleich zu Raumluf; dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; es waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Nach 3 Tagen Versuchsdauer ist das Endothelvolumen in der NO₂-Expositionsgruppe und der Raumlufgruppe konstant. Die zu prüfende These konnte somit bestätigt werden.

iii. *Das Gesamtvolumen der Alveolarsepten nimmt nach 21 Tagen NO₂-Exposition im Vergleich zur Kontrollgruppe ab.*

Hier wurde das Gesamtvolumen der Alveolarsepten nach 21 Tagen NO₂-Exposition mit dem der 21-Tage-Kontrollgruppe verglichen. Die Werte wurden danach auf das Körpergewicht normiert.

Es ergaben sich diese Werte:

	Expositionsgruppe	
	Raumluf(21Tage)	NO ₂ (21Tage)
V(sept) (mm ³)	477 \pm 40	732 \pm 91*
V(sept)/kgKG(mm ³ /kg)	1907 \pm 213	3484 \pm 561*

Tab. 4.5.2.2iii: septales Volumen und septales massenspezifisches Volumen nach 21 Tagen in Abhängigkeit von der Exposition; angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet durch * ($p < 0,05$)

Nach 21 Tagen NO_2 -Exposition war eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) des Volumens der Alveolarsepten, sowohl bei den absoluten Werten als auch bei den auf das Körpergewicht bezogenen Daten, festzustellen. Die zu prüfende These ist somit widerlegt.

iv. Nach 21 Tagen NO_2 -Exposition nimmt das interstitielle Volumen zu.

Es wurde das Volumen des Gesamtinterstitiums von Expositions- und Kontrollgruppe nach 21 Tagen Versuchsdauer verglichen. Angegeben sind die absoluten und die auf das Körpergewicht bezogenen Werte.

Folgende Werte wurden ermittelt:

	Expositionsgruppe	
	Raumluft(21Tage)	NO_2 (21Tage)
$V(\text{int}) \text{ (mm}^3\text{)}$	220 ± 20	$331 \pm 63^*$
$V(\text{int})/\text{kgKG}(\text{mm}^3/\text{kg})$	880 ± 104	$1571 \pm 304^*$

Tab. 4.5.2iv: Interstitielles Volumen, absolut und auf das Körpergewicht normiert abhängig von der Expositionsgruppe nach 21 Tagen; angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet durch * ($p < 0,001$)

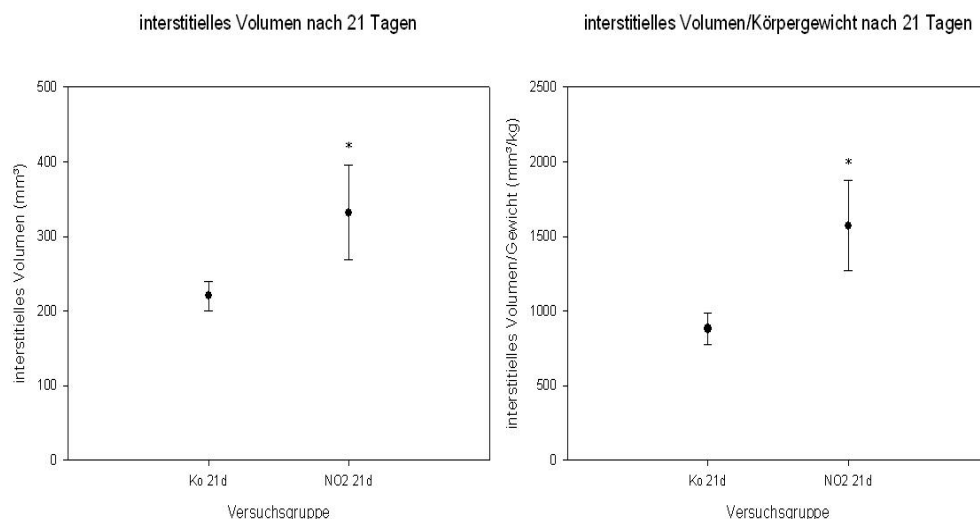


Abb. 4.5.2iv: interstitielles Volumen und interstitielles Volumen/Körpergewicht abhängig von der Exposition; dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe sind gekennzeichnet durch * ($p < 0,001$)

Nach 21 Tagen NO₂-Exposition hat das interstitielle Volumen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant zugenommen, sowohl absolut als auch auf das Körpergewicht bezogen ($p < 0,001$). Die zu prüfende These konnte also bestätigt werden.

v. *Nach 21 Tagen NO₂-Exposition nimmt die Menge an kollagenen und elastischen Fasern in den Alveolarsepten im Vergleich zur Kontrollgruppe ab.*

Zur Überprüfung dieser These wurde das Volumen der Elastin- bzw. Kollagenfasern (V(Koll), V(Elas)) innerhalb der Alveolarsepten nach 21 Tagen NO₂-Exposition jeweils mit dem der 21-Tage Kontrollgruppe verglichen. Diese Werte wurden wiederum auf das Körpergewicht normiert.

v.a Kollagen

Die Berechnung der in den Septen enthaltenen Kollagenvolumina ergab folgende Werte:

	Expositionsgruppe	
	Raumluf(21Tage)	NO ₂ (21Tage)
V(Koll) (mm ³)	18±3	23±8
V(Koll)/kgKG(mm ³ /kg)	70±14	108±42*

Tab. 4.5.2.2v.a: Kollagenvolumen und Kollagenvolumen pro Körpergewicht in Abhängigkeit von der Exposition nach 21 Tagen; angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung; signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet durch * ($p < 0,05$)

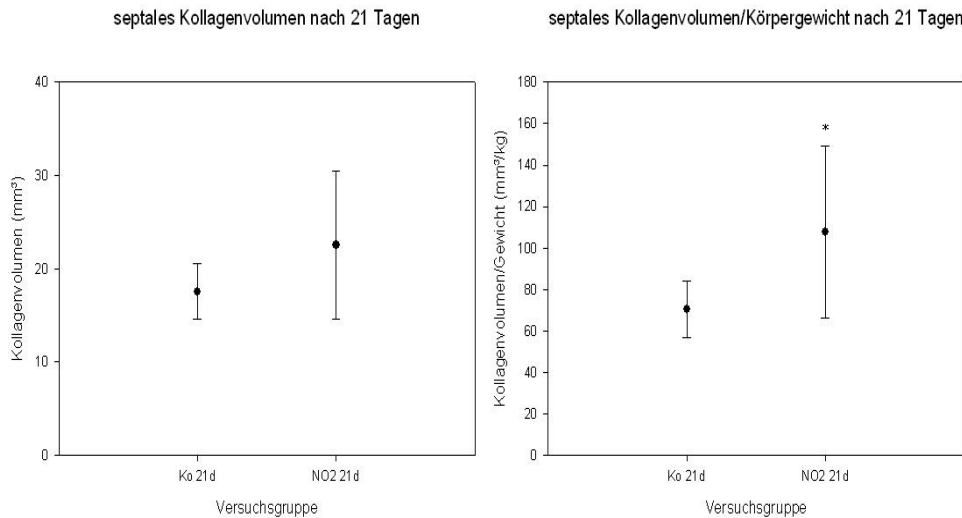


Abb. 4.5.2.2v.a: Kollagenvolumen innerhalb der Alveolarsepten in Abhängigkeit von der Exposition nach 21 Tagen, Kollagenvolumen bezogen auf das Körpergewicht innerhalb der Alveolarsepten in Abhängigkeit von der Exposition nach 21 Tagen; dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe sind gekennzeichnet durch * ($p < 0,05$)

Es zeigt sich entgegen der vor Versuchsbeginn aufgestellten These unter NO₂-Exposition nach 21 Tagen eine tendenzielle Zunahme des septalen Kollagenvolumens. Bezogen auf das Körpergewicht ist dieser Unterschied signifikant ($p < 0,05$). Die zu prüfende These konnte somit nicht bestätigt werden.

Bei der Interpretation dieser Daten ist eine innerhalb der NO₂-Expositionsgruppe auftretende große Schwankungsbreite der Kollagenvolumina zu berücksichtigen. Die Werte lagen absolut zwischen 13 mm³ und 34 mm³ (Standardabweichung \pm 8 mm³) und bezogen auf das Körpergewicht zwischen 64 mm³/kg und 160 mm³/kg (Standardabweichung \pm 42 mm³/kg).

v.b Elastin

Korrespondierend zur Berechnung der Kollagenvolumina erfolgte die Bestimmung der Elastinvolumina innerhalb der Alveolarsepten.

Die septalen Elastinvolumina sind:

	Expositionsgruppe	
	Raumluft(21Tage)	NO ₂ (21Tage)
V(Elas) (mm ³)	9±2	17±3*
V(Elas)/kgKG(mm ³ /kg)	36±10	80±18 *

Tab. 4.5.2.2v.b: Elastinvolumen und Elastinvolumen pro Körpergewicht in Abhängigkeit von der Exposition; angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung; signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet durch * (p<0,001)

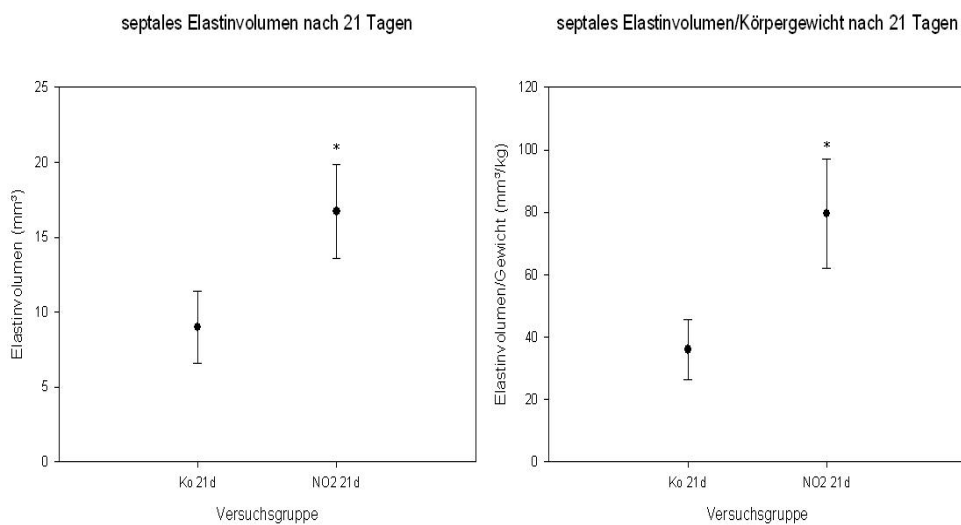


Abb. 4.5.2.2v.b: Septales Elastinvolumen nach 21 Tagen in Abhängigkeit von der Exposition, septales Elastinvolumen bezogen auf das Körpergewicht nach 21 Tagen in Abhängigkeit von der Exposition; dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung; signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe sind gekennzeichnet durch * (p<0,001)

Sowohl die absoluten als auch die auf das Körpergewicht bezogenen alveolären Elastinvolumina sind in der NO₂-Expositionsgruppe signifikant (p<0,001) größer als in der Kontrollgruppe. Die zu prüfende These wurde somit widerlegt.

vi. Nach 21 Tagen NO_2 -Exposition ändert sich das Verhältnis der in den Alveolarsepten enthaltenen Kollagen- und Elastinmenge zueinander (Kollagen:Elastin-Ratio).

Hierzu wurde das Verhältnis der in den Alveolarsepten enthaltenen Kollagen- und Elastinmenge nach 21 Tagen NO_2 -Exposition bestimmt und mit dem der Kontrollgruppe verglichen. Da es sich hier um ein Verhältnis zweier Größen aus jeweils einem Tier handelt, ist eine Normierung auf das Körpergewicht nicht notwendig.

Nach 21 Tagen Versuchsdauer werden für die Kontroll- und Expositionsgruppe folgende Werte für die Kollagen:Elastin-Ratio ermittelt:

	Expositionsgruppe	
	Raumluft(21Tage)	NO_2 (21Tage)
R(Koll/Elas)	$2,11 \pm 0,75$	$1,34 \pm 0,32^*$

Tab. 4.5.2.2vi: Kollagen:Elastin-Ratio nach 21 Tagen in Abhängigkeit von der Exposition; angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet durch * ($p < 0,05$)

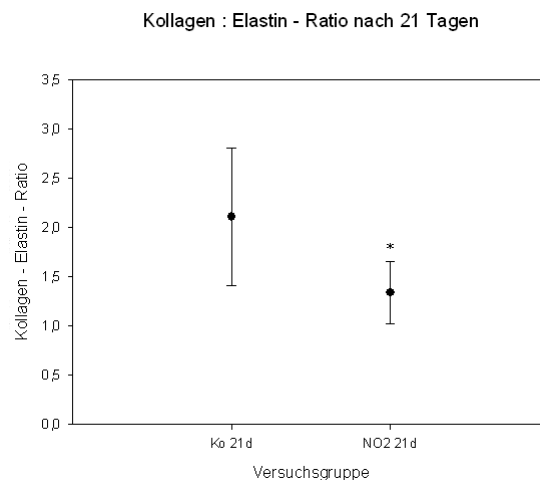


Abb. 4.5.2.2vi: Kollagen:Elastin-Ratio nach 21 Tagen in Abhängigkeit von der Exposition; dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung; signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe sind gekennzeichnet durch * ($p < 0,05$)

Zwischen beiden Gruppen stellte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) mit relativer Abnahme des septalen Elastinvolumens im Verhältnis zum septalen Kollagenvolumen dar. Die zu prüfende These konnte somit bestätigt werden.

5. Diskussion

5.1 Untersuchungsrelevante Rahmenbedingungen

5.1.1 Bedeutung der COPD

Die COPD ist eine weltweit verbreitete chronische Erkrankung und eine bedeutende Ursache für Morbidität und Mortalität (31). Zu ihrer Prävalenz gibt es bislang nur wenige Daten. In Nordamerika und Europa liegt sie zwischen 4 und 10% der erwachsenen Bevölkerung (30). Ihre Hauptrisikofaktoren Zigarettenrauchen, Nutzung fossiler Brennstoffe und Luftverschmutzung sind weit verbreitet und zunehmend. Daher ist in Zukunft mit einer weiteren Steigerung ihrer Prävalenz zu rechnen.

Es gibt Prognosen, dass die COPD im Jahr 2020 die dritthäufigste Todesursache und die fünfhäufigste Ursache von Arbeitsunfähigkeit sein wird (44). Aufgrund dessen stellt die COPD zugleich ein zunehmendes volkswirtschaftliches Problem dar (85). Ein bedeutender Anteil der durch die COPD entstehenden Kosten wird dabei durch wenige Patienten verursacht. Hierbei handelt es sich um die Patienten mit einer schweren Erkrankung. Durch häufige Exazerbationen sind wiederholte Krankenhausaufenthalte bedingt, und die Lungenfunktion und die allgemeine körperliche Verfassung des Patienten nehmen weiter ab (31). Laut einer Studie zur Verteilung der durch die COPD anfallenden Kosten entstehen über 70% durch stationäre Behandlung und Notfallversorgung (86).

Trotz dieser alarmierenden Prognose existieren bislang nur unvollständige Daten sowohl zur Epidemiologie als auch zur ökonomischen Bedeutung der COPD. Das führt dazu, dass sie sowohl unter Medizinern, als auch unter Politikern, die für die Verteilung finanzieller Mittel für Forschung und Behandlung verantwortlich sind, zu wenig beachtet wird (30, 85).

Bislang existieren verschiedene pharmakologische und nicht pharmakologische Optionen zur Therapie der COPD. Durch klinische Studien ist zurzeit allerdings nur die Wirksamkeit eines Teils der angewandten Verfahren bewiesen. Hierzu zählen die Einstellung des Rauchens (1), die Langzeit-Sauerstofftherapie, wenn indiziert (54, 60) und eine hochkalorische Kost bei nicht übergewichtigen Patienten (74).

Bislang vorliegende Daten legen nahe, dass auch durch inhalative Corticosteroide und durch eine Kombination aus inhalativen Corticosteroiden und langwirksamen Beta₂-Mimetika die Mortalität gesenkt wird (39, 46, 78). Es fehlen jedoch Daten aus randomisierten placebokontrollierten Studien, die dies beweisen. In einer entsprechenden Studie konnte durch eine Kombinationstherapie mit Corticosteroiden und Beta₂-Mimetika keine signifikante Senkung der Mortalität gegenüber einer Monotherapie oder einer Placebogabe nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch eine Verbesserung bei der Anzahl der Exazerbationen, der Lungenfunktion sowie des allgemeinen gesundheitlichen Status (7).

5.1.2 Forschung an Tiermodellen

Die grundsätzliche Bedeutung von Tiermodellen sowie die zu beachtenden Einschränkungen in der Aussage von tierexperimentell gewonnenen Ergebnissen wurden eingangs beschrieben. Zur Diskussion der vorliegenden Ergebnisse sind folgende Aspekte nochmals hervorzuheben:

Tiermodelle stellen einen wichtigen Baustein bei der Erforschung menschlicher Krankheiten dar. Anhand von Tiermodellen lassen sich Erkenntnisse zur Ätiologie und Pathogenese einer Erkrankung gewinnen. Neue Therapien können bezüglich ihrer Sicherheit und Wirksamkeit vor dem Einsatz am Menschen getestet werden (14). Tiermodelle dienen sowohl zur Erforschung der Ätiologie und Pathogenese einer Erkrankung als auch zur Erprobung neuer Therapien (14, 76). Damit stellen sie ein wichtiges Bindeglied zwischen Laborversuchen und Studien am Menschen dar (14).

5.1.3 Einsatz von Stickstoffdioxid im Tierversuch

Stickstoffdioxid ist ein Luftschadstoff, der bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe entsteht. Es kommt in Motorabgasen vor (24), findet sich aber auch im Zigarettenrauch und entsteht beim Kochen oder Heizen mit offener Flamme (42, 72). Die Stickstoffdioxidkonzentration in der Luft liegt in ländlichen Regionen unter 5 ppb (parts per billion), in städtischen Gebieten jedoch bei 10 bis 75 ppb mit Spitzenwerten über 500 ppb (24, 72). Durch seine schlechte Wasserlöslichkeit wird es nur in geringem Umfang von der Schleimhaut der Atemwege resorbiert und kann bei Inspiration bis in die kleinen Atemwege

eindringen. Die maximale Resorption wird an den Bronchioli terminales erreicht (10).

Es wirkt toxisch auf den Respirationstrakt und ist bei Inhalation hoher Dosen durch die Entstehung eines Lungenödems tödlich. Die Inhalation niedrigerer Dosen über kurze Zeit führt zu reversiblen Effekten wie einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion, einer Hyperreagibilität des Bronchialsystems sowie einer Entzündung des Respirationstraktes. Die Exposition über einen längeren Zeitraum bewirkt durch die Entstehung eines Emphysems sowie einer Lungenfibrose einen irreversiblen Schaden (10).

Es wurden bereits verschiedene Studien durchgeführt, die die verschiedenen Aspekte der toxischen Wirkung von Stickstoffdioxid auf den Respirationstrakt untersucht haben (z.B. 4, 20, 26, 40, 83, 90). Die genaue Kenntnis der durch Stickstoffdioxidinhalation hervorgerufenen Schäden ermöglicht die Etablierung von Tiermodellen der menschlichen COPD, einschließlich der Einschätzung ihrer Möglichkeiten und Grenzen.

5.1.4 Auswahl der Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Fischer 344-Ratten im Alter von 6 bis 8 Wochen zu Versuchsbeginn. Tiere dieses Stammes werden häufig in Tierversuchen verwendet. Die Morphologie ihrer Lungen, einschließlich der im Alter auftretenden Veränderungen sind gut untersucht (56, 70).

Es wurden ausschließlich männliche Tiere untersucht. Daher mussten Effekte durch die zyklischen Hormonschwankungen beim weiblichen Geschlecht nicht berücksichtigt werden. So gibt es Arbeiten, aus denen sich ein Zusammenhang zwischen Östrogenen und Alveolenbildung ableiten lässt (49).

5.2 Diskussion der Versuchsergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Tiermodell des menschlichen Lungenemphysems zu etablieren, wobei der Schwerpunkt auf der ultrastrukturellen Beurteilung der Lungen lag.

Die durchgeführte Gewichtsbestimmung der Tiere zeigte beim Vergleich zwischen 3- und 21-tägiger Expositionsdauer eine signifikante Zunahme des Körpergewichts nach 21 Tagen, was sich bei Angabe der prozentualen Gewichtszunahme noch stärker verdeutlicht. Männliche Fischer 344-Ratten

nehmen bis zu einem Lebensalter von 3 Monaten schnell an Gewicht zu (56). Die im Versuch untersuchten Tiere waren zu Beginn der Exposition zwischen 6 und 8 Wochen alt und befanden sich damit noch im Wachstum. Dies erklärt die Gewichtszunahme im Verlauf des Versuches. Um Wachstumseffekte zu erkennen, wurde das Experiment mit zwei zur jeweiligen Expositionsgruppe altersgleichen Kontrollgruppen durchgeführt.

Es wäre alternativ zu überlegen, einen solchen Expositionsversuch mit ausgewachsenen Tieren durchzuführen, um diesen Wachstumseffekt auszuschließen. Da solche Tiere deutlich teurer sind, und es auch Ziel sein sollte, ein günstiges und damit breit anwendbares Tiermodell zu finden, wurde auf jugendliche Versuchstiere zurückgegriffen.

Die Tiere der Kontrollgruppe waren jeweils altersgleich zur Expositionsgruppe. Der Vergleich der Körpergewichte zwischen Expositions- und Kontrollgruppe bei gleicher Versuchsdauer zeigte eine signifikant geringere Gewichtszunahme der NO₂-exponierten Tiere. Auch dies wird durch die Berechnung der prozentualen Gewichtszunahme verdeutlicht.

Bei Menschen, die unter einer schweren COPD leiden, ist ein Verlust an Körpergewicht, hauptsächlich durch einen Verlust an Muskelmasse, bekannt (5, 74). Auch bei Tiermodellen der COPD ist ein Verlust an Körpergewicht beschrieben (25, 40, 83). Da die Tiere bis auf die NO₂-Exposition unter denselben Bedingungen gehalten wurden, ist dieser Effekt direkt oder indirekt auf die Exposition zurückzuführen.

Die Versuchstiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Es fiel auf, dass die NO₂-exponierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Nahrung zu sich nahmen (22, 99). Die geringere Gewichtszunahme ist also ein indirekter Effekt infolge einer verminderten Kalorienzufuhr, welche durch die NO₂-Exposition ausgelöst wurde.

Faktoren, die Einfluss auf den Energieverbrauch der Tiere haben, wurden im vorliegenden Versuch nicht untersucht. Zum einen könnte unter dem Einfluss des Stickstoffdioxids die Aktivität der Tiere gedämpft, und damit ihr Energieverbrauch gemindert sein. Andererseits könnten unter der NO₂-Exposition Stoffwechselvorgänge beeinflusst werden, was den Energieverbrauch der Tiere ändert. In der vorliegenden rein morphologischen Studie können hierzu keine Aussagen getroffen werden. Gerade wegen der Relevanz des Gewichtsverlustes

als Prognosefaktor der menschlichen COPD sind weitere Studien hierzu sicher sinnvoll.

Das Lungenemphysem ist durch eine irreversible Erweiterung der Alveolen charakterisiert (23). Mit den in dieser Arbeit angewendeten Methoden ist nur die qualitative Beobachtung einer erhöhten Alveolenweite möglich, die Alveolenweite wurde jedoch im Rahmen einer anderen Dissertation quantitativ bestimmt (99). Nach 21 Tagen Exposition gegenüber Stickstoffdioxid war das Lungenvolumen übereinstimmend mit anderen Studien (83, 90) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vergrößert, was darauf hinweist, dass sich auch die einzelnen Alveolen vergrößert haben. Im Rahmen der von G. Zimmermann durchgeführten Untersuchung wurde eine Erweiterung der Alveolen unter NO₂-Exposition nachgewiesen (99). Alveolen mit vergrößertem Volumen entstehen durch zwei Mechanismen: Durch die Zerstörung von Alveolarsepten und durch Überdehnung aufgrund eines Verlustes an elastischen Rückstellkräften (21).

Die Vergrößerung der Alveolen wäre also auch Folge eines Verlustes an elastischen Rückstellkräften und damit an extrazellulären Fasern. Entgegen dieser Erwartung zeigte sich nach 21-tägiger Versuchsdauer jedoch eine signifikante Zunahme an elastischen Fasern, beim Kollagen war der Unterschied nur auf das Körpergewicht bezogen signifikant. Das Elastinvolumen hat im Vergleich zum Kollagenvolumen also stärker zugenommen, was sich in der Kollagen:Elastin-Ratio widerspiegelt.

Es gibt bereits Daten zur Auswirkung einer NO₂-Exposition auf das extrazelluläre Fasergerüst der Lunge. Beim Vergleich solcher Daten mit der vorliegenden Studie muss neben dem Expositionsschema mit der Konzentration an Stickstoffdioxid auch die untersuchte Spezies beachtet werden, da unterschiedliche Reaktionen verschiedener Tierarten auf inhalative Noxen bekannt sind (10). Die Datenlage zur Auswirkung einer Stickstoffdioxidexposition auf das extrazelluläre Fasergerüst der Lunge ist nicht einheitlich. Dynamische Effekte sind durch das vorliegende Versuchsschema nicht auszuschließen. Das heißt, eine akute Verminderung des Kollagengehaltes der Lunge mit nachfolgend gesteigerter Neusynthese, so dass nach 21-tägiger Exposition kein Unterschied zu quantifizieren ist (40), entgeht der Beobachtung. Die Entstehung eines Emphysems wäre zu erwarten, wenn der Verlust an elastischen Fasern durch Neusynthese nicht mehr ausgeglichen werden könnte. Dies entspricht einer

Theorie zur Emphysempathogenese: Der Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Abbau und Reparatur (79).

Im Lungenparenchym liegen elastische Fasern hauptsächlich als Ring um den Eingang der Alveolen vor, dieser stellt sich im Transmissionselektronenmikroskop als sogenanntes Endknöpfchen dar (55). Daher wäre eine Verminderung der Menge an Elastin bei einem Verlust an Alveolarsepten zu erwarten, was sich bei der hier durchgeführten Auswertung in einer Abnahme des septalen Volumens zeigen würde. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten jedoch eine Zunahme des Volumens der Alveolarsepten sowie des Gesamtinterstitiums, von dem das Elastin ein Anteil ist. Da die Kompartimente, in denen das Elastin enthalten ist, an Volumen zugenommen haben, hat also auch das absolute Elastinvolumen zugenommen. Mögliche Ursache ist das noch nicht abgeschlossene Wachstum der Tiere.

Die Zunahme des interstitiellen Raumes, also des Bindegewebes, kann als Zeichen einer Fibrosierung gewertet werden, die ein Merkmal der COPD ist (23).

Ein weiterer Aspekt zur Erklärung der abweichend von der Hypothese stattgefundenen Zunahme des Volumens der elastischen Fasern und auch der Alveolarsepten ist, dass es sich bei der COPD um eine chronische Erkrankung handelt. Tierexperimentell wurde sie bislang in Expositionsversuchen über mehrere Monate nachgewiesen (10, 87). Durch die im Vergleich hierzu kurze Expositionsdauer von 21 Tagen werden neben den erwarteten chronischen Schäden auch noch akute Reaktionen auf die Stickstoffdioxidexposition vorhanden sein.

Die kurzzeitige NO₂-Exposition der Versuchstiere über 3 Tage erlaubt eine Beurteilung der akuten durch die Noxe hervorgerufenen Schäden. Es zeigte sich eine Zunahme des epithelialen Volumens, wobei qualitativ vermehrt Pneumozyten Typ II auffielen. Dieser Befund steht in Einklang mit einer Studie von P. Barth et al (4), in der bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten durch die kurzzeitige Inhalation von Stickstoffdioxid eine akute Entzündung der Alveolarsepten verursacht wurde. Nach kontinuierlicher Exposition gegenüber 10ppm NO₂ über 3 Tage zeigten sich lichtmikroskopisch eine interstitielle Infiltration sowie hyperplastische Pneumozyten Typ II in den Alveolarsepten. Pneumozyten Typ II besitzen die Fähigkeit zur Zellteilung und Differenzierung in Pneumozyten Typ I (20). Die im vorliegenden Versuch beobachteten

Veränderungen lassen also auf eine akute Schädigung der Alveolarsepten, hervorgerufen durch die Stickstoffdioxidexposition, mit nachfolgender Proliferation und Teilung der Pneumozyten Typ II, schließen.

Das endotheliale Volumen änderte sich unter NO₂-Exposition nicht. Das bedeutet, dass die Verlängerung der Diffusionsstrecke vom Alveolarraum zu den Kapillaren durch eine Verbreiterung der Epithelschicht entsteht. Dieser Befund ist ebenfalls ein Beleg dafür, dass das vergrößerte Epithelvolumen eine Folge der NO₂-Exposition ist. Läge ein reiner Wachstumseffekt vor, so hätte auch das Endothelvolumen zunehmen müssen.

Die durch die NO₂-Exposition bedingte Entzündungsreaktion zeigt sich auch in einer erhöhten Anzahl von Entzündungszellen, wobei H. Garn (26) ein Maximum nach 3 Tagen Exposition beschrieben hat. Die beobachtete erhöhte Anzahl an Alveolarmakrophagen nach dreitägiger Exposition entspricht damit der Erwartung einer entzündlichen Reaktion.

5.3 Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse im Gesamtkontext der Studie

Die vorliegende Arbeit war Teil einer Studie zur Auswirkung einer Stickstoffdioxidexposition auf männliche Fischer 344-Ratten (22), wobei der Fokus dieser Arbeit auf den ultrastrukturellen Veränderungen der Alveolarsepten lag.

Im Rahmen der Studie wurden an den Lungen derselben Versuchstiere sowie von Tieren in Versuchsgruppen mit anderen Expositionsdauern weitere Untersuchungen durchgeführt. Zum Einen wurde mit Hilfe lichtmikroskopischer stereologischer Methoden die Alveolenweite bestimmt. Zum Anderen wurde mit histochemischen Färbungen geprüft, ob die NO₂-Exposition einen Einfluss auf Apoptose und Proliferation im Lungenparenchym hat. Diese Untersuchungen wurden in einer weiteren Dissertation durch G. Zimmermann durchgeführt (99).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Körpergewicht der Versuchstiere in der Kontroll- und Expositionsgruppe nach 3 und 21 Tagen bestimmt. Das Körpergewicht der Tiere in den weiteren Versuchsgruppen der Gesamtstudie wurde ebenfalls bestimmt. Es war unter NO₂-Exposition niedriger als in der Kontrollgruppe und glich sich nach Erholung unter Raumluft der Kontrollgruppe wieder an (99). Prinzipiell sind zwei Erklärungsansätze für das geringere

Körpergewicht möglich; eine verminderte Energiezufuhr oder ein erhöhter Verbrauch. Während des Versuches wurde die aufgenommene Futtermenge unter Exposition und in der Kontrollgruppe ermittelt. Diese war unter NO₂-Exposition niedriger als in der Kontrollgruppe (22). Während der Erholungszeit unter Raumlufte nahmen die Versuchstiere wieder mehr Futter auf, und das Körpergewicht glich sich der Kontrollgruppe an (22). Die Ursache der verminderten Futteraufnahme unter NO₂-Exposition lässt sich mit den durchgeführten Methoden nicht abschließend klären, hierfür war die vorliegende Arbeit nicht konzipiert. Möglich wäre ein verminderter Antrieb zur Nahrungsaufnahme durch die mittels Exposition ausgelöste Inflammationsreaktion oder eine sensorische Störung sowohl durch eine Beeinträchtigung des Geschmackssinns der Tiere als auch durch Reaktion des Stickstoffdioxides mit dem im Käfig vorhandenen Futter. Die verminderte Futteraufnahme schließt eine zusätzlich vorhandene katabole Stoffwechsellaage mit erhöhtem Energieverbrauch und Abbau von Körpermasse nicht aus. Diese kann mit den vorliegenden Methoden jedoch nicht detektiert werden. Insgesamt lässt sich festhalten, dass die beobachtete Körpergewichtsreduktion unter NO₂-Exposition zumindest teilweise auf eine verminderte Futteraufnahme zurückzuführen ist, deren ursächliche Klärung jedoch nicht Ziel dieser Arbeit war. Lungenvolumen und massenspezifisches Lungenvolumen wurden für die vorliegende Arbeit nach 3 und 21 Tagen bestimmt. Diese Werte liegen für die weiteren Versuchsgruppen ebenfalls vor. Unter NO₂-Exposition fiel im Vergleich zur Kontrollgruppe im Verlauf von 3 bis 21 Tagen ein zunehmendes massenspezifisches Lungenvolumen auf, welches sich nach 21 Tagen Erholung unter Raumlufte der Kontrollgruppe wieder anglich (22, 99).

Während elektronenoptisch zur Alveolenweite nur qualitative Aussagen gemacht werden konnten, wurde diese am Lichtmikroskop quantitativ bestimmt. Die volumengewichtete Alveolenweite verringerte sich zunächst und stieg im Verlauf des Versuches wieder an. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war diese in der Expositionsgruppe nach 3 Tagen verringert. Nach einer dreitägigen Stickstoffdioxidexposition fiel bei der Untersuchung am Elektronenmikroskop eine erhöhte Anzahl an Alveolarmakrophagen auf der Oberfläche der Alveolarsepten auf. Die Alveolarsepten selbst waren durch eine verbreiterte Epithelschicht verdickt. Dies sind mögliche Ursachen für die am Lichtmikroskop

beobachtete verringerte Alveolenweite. Nach 21 Tagen Versuchsdauer war die volumengewichtete Alveolenweite unter NO₂-Exposition größer als in der Kontrollgruppe und blieb auch nach Erholung im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (99). Elektronenoptisch zeigte sich hier im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Expositionsgruppe keine erhöhte Anzahl an Alveolarmakrophagen, auch die Epithelschicht war nicht verdickt.

Ein erhöhtes Lungenvolumen sowie eine erhöhte Alveolenweite sind Kennzeichen eines Emphysems. Die durchgeführte Exposition hat also in den Lungen der Versuchstiere Veränderungen bewirkt, die Teilaspekte eines Emphysems widerspiegeln. Nach Erholung unter Raumluft hat sich das Lungenvolumen dem der Kontrollgruppe wieder angeglichen, was für einen Reparaturvorgang spricht. Dies wiederum zeigt, dass keine dem menschlichen Emphysem äquivalente Erkrankung bei den Versuchstieren hervorgerufen wurde, da dieses durch eine chronische irreparable Schädigung der Lunge gekennzeichnet ist. Es bleibt zu klären, welche Versuchsparameter geändert werden müssten, um ein Emphysem zu induzieren. Die Art der Exposition, eine kontinuierliche Beimischung von Stickstoffdioxid zur Atemluft, sollte zur Induktion eines Emphysems führen können. Dieses Gas ist ein Hauptbestandteil des Zigarettenrauches, welcher als Hauptverursacher des menschlichen Emphysems gilt und bereits zur Etablierung von Tiermodellen verwendet wurde (14, 76, 98). Auch eine ausschließlich mit Stickstoffdioxid erfolgende Exposition wurde bereits im Tierversuch durchgeführt (26, 58). Die gesamte Expositionsdauer war im vorliegenden Versuch jedoch mit maximal 21 Tagen kurz, so dass zu überlegen ist, das Expositionsschema über einen längeren Zeitraum anzuwenden, um dadurch möglicherweise ein Emphysem zu induzieren. Das Gesamtvolumen der Alveolarmakrophagen wurde lichtmikroskopisch quantitativ bestimmt und war nach 3 Tagen unter NO₂-Exposition ein dreifach erhöht. Dieser Unterschied verringerte sich im Verlauf des Versuches, es zeigte sich jedoch auch noch nach 21 Tagen eine signifikante Erhöhung (22). Das nach dreitägiger Exposition erhöhte Volumen der Alveolarmakrophagen korreliert mit der qualitativen Beobachtung am Elektronenmikroskop. Mögliche Ursache ist ein entzündliches Geschehen als Antwort auf die Exposition gegenüber Stickstoffdioxid.

Die histochemischen Untersuchungen zeigten nach 3 Tagen unter NO₂-Exposition eine deutlich erhöhte Proliferation von Alveolarzellen, die im Verlauf des Versuches wieder absank, jedoch auch noch nach Erholung unter Raumluft im Vergleich zur Kontrolle erhöht war (99). Auch Apoptosen wurden unter NO₂-Exposition vermehrt beobachtet. Die Anzahl von Apoptosen war nach 3 Tagen Exposition am höchsten und sank im Verlauf des Versuches wieder ab. Nach Erholung unter Raumluft glich sich die Zahl der Apoptosen der Kontrollgruppe wieder an (99). Es wurden hauptsächlich Pneumozyten Typ II apoptotisch, Endothelzellen waren kaum betroffen (99). Es zeigt sich also unter NO₂-Exposition sowohl eine vermehrte Anzahl von apoptotischen als auch von proliferierenden Zellen. Proliferierende Zellen traten vor allem zu Beginn des Versuches auf, die Anzahl der Apoptosen stieg langsamer an. Dies spricht dafür, dass durch die NO₂-Exposition nach anfänglicher Schädigung der Pneumozyten Typ I zunächst eine überschießende Proliferation von Pneumozyten Typ II ausgelöst wurde (20). Nachfolgend wurde der normale Septenaufbau durch eine gesteigerte Apoptose von Zellen wieder hergestellt. Von diesem Prozess sind hauptsächlich Epithel- und kaum Endothelzellen betroffen. Die durchgeführten histochemischen Färbungen zeigten, dass meist Pneumozyten Typ II betroffen sind (99). Dies korreliert mit der qualitativen Beobachtung am Elektronenmikroskop, dass sich die Alveolarepithelschicht nach NO₂-Exposition über 3 Tage verdickt hat, eine Beobachtung, die durch die quantitativen Daten einer Zunahme des Gesamtvolumen des Alveolarepithels bei gleichbleibendem Endothelvolumen belegt wird. Die Epithelzellen, welche die Alveolarwand bedeckten, zeigten zum Teil Differenzierungsmerkmale von Pneumozyten Typ II. Dies unterstützt die These, dass die Pneumozyten Typ II ein Reservoir darstellen, welches durch Zellteilung und Differenzierung verloren gegangene Pneumozyten Typ I ersetzen kann. Die Beobachtung, dass Endothelzellen unter NO₂-Exposition nur sehr geringe Änderungen in Apoptose und Proliferation zeigen, korreliert mit der elektronenoptischen Beobachtung eines konstanten endothelialen Volumens unter NO₂-Exposition.

5.4 Schlussfolgerung

Mit Hilfe des vorliegenden Versuchsprotokolls ließen sich im Lungenparenchym von männlichen Fischer 344-Ratten Veränderungen verursachen, die auf eine Stickstoffdioxidexposition zurückzuführen sind. Nach 3 Tagen Exposition zeigte sich eine Entzündungsreaktion, die nach 21 Tagen Exposition nicht mehr nachweisbar war. Ultrastrukturell fanden sich Hinweise auf eine Veränderung des extrazellulären Fasergerüsts, ein Emphysem, im Sinne des Verlustes von Alveolarsepten, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Diese Beobachtungen zeigen, dass im durchgeführten Versuch keine dem Lungenemphysem entsprechenden morphologischen Veränderungen erzeugt werden konnten. Eine chronische Schädigung der Lunge mit den Zeichen eines Emphysems ist nach langandauernder Exposition gegenüber inhalativen Noxen zu erwarten (10). Daher ist zu überlegen, die Exposition über einen längeren Zeitraum durchzuführen, um ein Tiermodell mit den Eigenschaften eines Emphysems zu erhalten. Da nach 3 Tagen Exposition eine akute Auswirkung auf die Alveolarsepten erkennbar war, die nach 21-tägiger Exposition abgeklungen schien, müssen hier Reparaturmechanismen vorliegen. Die Erforschung solcher Reparaturmechanismen könnte zur Entwicklung neuer Therapien in der Behandlung der COPD führen. Eine Substanz, die im Tiermodell zur Reparatur eines experimentell induzierten Emphysems geführt hat, ist die Retinolsäure (50). Obwohl auch am Menschen morphologische Parameter durch Retinolsäure beeinflusst wurden, konnte bislang kein klinischer Nutzen nachgewiesen werden (69).

Es ist bekannt, dass inhalative Noxen bei verschiedenen Spezies unterschiedlich starke Schäden an der Lunge hervorrufen (98). Das Verständnis artspezifischer Reparaturmechanismen und insbesondere das Aufzeigen von Unterschieden zum Menschen können zur Klärung der Pathogenese der menschlichen COPD beitragen. Solche Unterschiede bieten Ansätze für neue Therapiekonzepte.

6. Zusammenfassung

Die COPD ist eine weltweit verbreitete Erkrankung. Als Hauptursache gilt das Zigarettenrauchen. Bislang existiert keine Therapie, mit der sich die durch die COPD verursachten morphologischen und funktionellen Schäden an der Lunge rückgängig machen lassen.

Die Forschung an Tiermodellen zielt neben der Erforschung der Pathogenese von Erkrankungen auf die Entwicklung neuer Therapiestrategien.

Im vorliegenden Versuch wurden Fischer 344-Ratten für 3 bzw. 21 gegenüber 10 ppm Stickstoffdioxid exponiert. Die Lungen der so behandelten Tiere wurden nach Tötung am Transmissionselektronenmikroskop untersucht und mit Kontrollen aus raumluftexponierten Tieren verglichen. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der quantitativen Analyse der ultrastrukturellen Bestandteile der Alveolarsepten einschließlich der extrazellulären Fasern.

Nach 3 Tagen NO₂-Exposition ließ sich in den Alveolarsepten der Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Entzündung mit vermehrten Alveolarmakrophagen sowie einem erhöhten Epithelvolumen durch eine vermehrte Anzahl von Pneumozyten Typ II nachweisen. Nach 21 Tagen NO₂-Exposition bestand im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Veränderung in der Zusammensetzung des extrazellulären Fasergerüsts, Anzeichen im Sinne der Entstehung eines Emphysems ließen sich jedoch nicht nachweisen. Eine Wirkung der Exposition auf das Kapillarendothel war zu keinem Zeitpunkt feststellbar. Ob die beobachteten Unterschiede ein direkter Effekt durch die NO₂-Exposition sind, oder sekundär durch die verminderte Nahrungsaufnahme der NO₂-exponierten Tiere verursacht wurden, lässt sich anhand des vorliegenden Versuches nicht entscheiden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in eine Publikation eingeflossen, welche in der Zeitschrift „Thorax“ veröffentlicht wurde (22).

7. Summary

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) constitutes a worldwide problem, mainly caused by smoking. At present COPD lacks therapeutic options to ameliorate the morphological and functional changes to lung tissue associated with the disease. The elucidation of COPD pathogenesis and the testing of potential treatment strategies require the development of an animal model. To this extent the following study was undertaken. Male Fisher 344 Rats were exposed to 10 ppm of nitrogen dioxide for 3 or 21 days. The lungs of exposed animals were examined by transmission electron microscopy and compared to tissues of rats lacking nitrogen dioxide exposure.

The assay focused on the ultrastructure of alveolar walls, including extracellular fibres. We observed inflammation, indicated by and increased number of alveolar macrophages and increased alveolar volume, established by an increase in type II pneumocytes after three days of NO₂ treatment.

After 21 days of exposure we saw a change in the composition of extracellular fibres. However, we did not observe any signs of emphysema. Furthermore, the capillary endothelium appeared unchanged. However, the NO₂ exposed animals also consumed significantly less food than the control group.

Whether the detected differences stem from nitrogen dioxide exposure or were secondary to reduced food consumption could not be determined.

This assay was part of a study, published in journal “Thorax” (22).

8. Literatur

1. Anthonisen NR, Skeans MA, Wise RA, Manfreda J, Kanner RE, Connett JE: The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: A randomized clinical trial, *Ann Intern Med* 2005; 142: 233-239
2. Barnes PJ: Chronic obstructive pulmonary disease, *N Engl J Med* 2000; 343: 269-280
3. Barnes PJ: New concepts in chronic obstructive pulmonary disease, *Ann Rev Med* 2002; 54: 1-26
4. Barth PJ, Uhlarik S, Bittinger A, Wagner U, Rüschoff J: Diffuse alveolar damage in the rat lung after short and long term exposure to nitrogen dioxide, *Path Res Pract* 1994; 190: 33-41
5. Bernard S, Leblanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R, Maltais F: Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 629-634
6. Burri PH: Structural aspects of prenatal and postnatal development and growth of the lung; In: *McDonald JA (ed): Lung growth and development* 1997; Marcel Dekker, New York
7. Calverley PMA, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Yates JC: Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease, *N Engl J Med* 2007; 356: 775-789
8. Carp H, Miller F, Hoidal JR, Janoff A: Potential mechanism of emphysema: α 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity, *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 2041-2045
9. Ciba Guest Symposium Report. Terminology, definitions and classifications of chronic pulmonary emphysema and related conditions, *Thorax* 1959; 14: 286-299
10. Chitano P, Hosselet JJ, Mapp CE, Fabbri LM: Effect of oxidant air pollutants on the respiratory system: Insights from experimental animal research, *Eur Respir J* 1995; 8: 1357-1371

11. Churg A, Wang RD, Xie C, Wright, JL: α 1-Antitrypsin ameliorates cigarette smoke-induced emphysema in the mouse, *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 199-207
12. Croxton TL, Weinmann GG, Senior RM, Hoidal JR: Future research directions in chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Crit Care Med* 2002; 165: 838-844
13. Damiano VV, Tsang A, Kucich U, et al: Immunolocalization of elastase in human emphysematous lungs, *J Clin Invest* 1986; 78: 482-493
14. Dawkins PA, Stockley RA: Animal models of chronic obstructive pulmonary disease, *Thorax* 2001; 56: 972-977
15. Drenckhahn D: Zellenlehre, In: *Benninghoff-Anatomie, 15. Aufl.* 1994; Urban&Schwarzenberg
16. Drenckhahn D, Kugler P, Rahn BA: Systematik der Gewebe, In: *Benninghoff-Anatomie, 15. Aufl.* 1994; Urban&Schwarzenberg
17. Duncker HR: Atemapparat, In: *Benninghoff-Anatomie, 15. Aufl.* 1994; Urban&Schwarzenberg
18. Eidelman D, Saetta MP, Ghezzi H, et al: Cellularity of the alveolar walls in smokers and its relation to lung destruction. Functional implications, *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1547-1552
19. Evans MD, Pryor WA: Cigarette smoking emphysema, and damage to alpha-proteinase inhibitor, *Am J Physiol* 1994; 266: 2593-2606
20. Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G: Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂, *Exp Mol Path* 1975; 22: 142-150
21. Fehrenbach H: Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: Some critical remarks, *Pathobiology* 2002-03; 70: 277-283
22. Fehrenbach H, Zimmermann G, Starke E, Bratu VA, Conrad D, Yildirim AÖ, Fehrenbach A: Nitrogen dioxide induces apoptosis and proliferation but not emphysema in rat lungs, *Thorax* 2007; 62: 438-446
23. Fichter J, Sybrecht GW: chronische Bronchitis, chronisch obstruktive Bronchitis und Lungenemphysem, In: *TIM-Thiemes Innere Medizin, 1. Aufl.* 1999
24. Fishbein L: Sources, nature and levels of air pollutants, In: *Tomatis L (ed): Indoor and outdoor air pollution and human cancer* 1993; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany

25. Foronjy RF, Mercer BA, Maxfield MW, Powell CA, D'Armiento J, Okada Y: Structural emphysema does not correlate with lung-compliance: Lessons from the mouse smoking model, *Exp Lung Res* 2005; 31: 547-562
26. Garn H, Siese A, Stumpf S, Barth PJ, Müller B, Giemsa D: Shift toward an alternatively activated macrophage response in lungs of NO₂-exposed rats, *Am J Cell Mol Biol* 2003; 28: 186-396
27. Gehr P, Crapo JD: Morphometric analysis of the gas exchange region of the lung, In: *Gardner DE, Crapo JD, Massaro EJ (ed): Toxicology of the lung* 1988; Raven Press, New York
28. Gross P, Pfitzer E, Tolker M, et al: Experimental emphysema: Its production with papain in normal and silicotic rats, *Arch Environ Health* 1965; 11: 50-58
29. Gu H, Marth JD, Orban PC, et al: Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting, *Science* 1994; 265: 103-106
30. Halbert JR, Isonaka S, George D: Interpreting COPD prevalence estimates. What is the true burden of disease?, *Chest* 2003; 123: 1684-1692
31. Halpin DMG, Miravittles M: Chronic obstructive pulmonary disease. The disease and its burden to society, *The Proceedings of the American Thoracic Society* 2006; 3: 619-623
32. Hogg JC, Senior RM: Chronic obstructive pulmonary disease c2: pathology and biochemistry of emphysema, *Thorax* 2002; 57: 830-834
33. Huang L, Kuo YM, Gitschier J: The pallid gene encodes a novel, syntaxin 13-interacting protein involved in platelet storage pool deficiency, *Nature Genet* 1999; 23: 329-332
34. Huber GL, Davies P, Zwilling GR, Pochay VE, Hinds WC, Nicholas HA, Mahajan VK, Hayashi M, First MW: A morphologic and physiologic bioassay for quantifying alterations in the lung following experimental chronic inhalation of tobacco smoke, *Bull Eur Physiopathol Respir* 1981; 17: 269-327
35. Iqbal A, Schloss S, George D, Isonaka S: Worldwide guidelines for chronic obstructive pulmonary disease: A comparison of diagnosis and treatment recommendations, *Respirology* 2002; 7: 233-239

36. Janoff A, Sloan B, Weinbaum G, et al: Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localisation of the instilled elastase, *Am Rev Respir Dis* 1977; 115: 461
37. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR: Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections, *Histochemical Journal* 1979; 11: 447-455
38. Kao RC, Wehner NG, Skubitz KM, Gray BH, Hoidal JR: Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters, *J Clin Invest* 1988; 82: 1963-1973
39. Kiri VA, Bettoncelli G, Testi R, Viegi G: Inhaled corticosteroids are more effective in COPD patients when used with LABA than with SABA, *Respir Med* 2005; 99: 1115-1124
40. Kleinerman J, Ip MPC: Effects of nitrogen dioxide on elastin and collagen contents of the lung, *Arch Environ Health* 1978; 33: 228-232
41. Laennec RTH: A treatise on diseases of the chest and on mediate auscultation, Translated by: *Forbes J*, 4th ed. 1834, Longmans, London
42. Leaderer BP: Air pollutant emissions from kerosene space heaters, *Science* 1982; 218: 1113-1115
43. Leopold JG, Gough J: Centrilobular form of hypertrophic emphysema and its relation to chronic bronchitis, *Thorax* 1957; 12: 219-235
44. Lopez AD, Murray CC: The global burden of disease, 1990-2020; *Nat Med* 1998; 4: 1241-1243
45. Majzoub JA, Muglia LJ: Knockout mice, *N Engl J Med* 1996; 334: 904-907
46. Mapel DW, Hurley JS, Roblin D, Roberts M, Davis KJ, Schreiner R, Frost FJ: Survival of COPD patients using inhaled corticosteroids and long-acting beta agonists, *Respir Med* 2006; 100: 595-609
47. Martorana PA, Brand T, Gardi C, et al: The pallid mouse. A model of genetic alpha 1-antitrypsin deficiency, *Lab invest* 1993; 68: 233-241
48. Martorana PA, van Even P, Gardi C, et al: A 16-month study of the development of genetic emphysema in tight-skin mice, *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 226-232

49. Massaro D, Massaro GD: Estrogen regulates pulmonary alveola formation, loss and regeneration in mice, *Am Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L1154-L1159
50. Massaro GD, Massaro D: Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats, *Nat Med* 1997; 3: 675-677
51. McCallum WG: Types of injury: Destruction of the respiratory tract, In: *Saunders WB: A textbook of pathology, 7th ed.* 1940, Philadelphia 419-428
52. McCormack FX, Whitsett JA: The pulmonary collectins, SP-A and SP-D orchestrate innate immunity in the lung, *J Clin Invest* 2002; 109(6): 707-712
53. McLean KH: Microscopic anatomy of pulmonary emphysema, *Aust Ann Intern Med* 1956; 5: 73-88
54. Medical Research Council Working Party: Long term domiciliary oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating chronic bronchitis and emphysema: A report of the Medical Research Council Working Party, *Lancet* 1981; 1: 681-686
55. Mercer RR, Crapo JD: Spatial distribution of collagen and elastin fibers in the lungs, *J Appl Physiol* 1990; 69(2): 756-765
56. Mizuuchi T, Kida K, Fujino Y: Morphological studies of the growth and aging in the lungs of Fischer 344 male rats, *Exp Gerontol* 1994; 29(5): 553-567
57. Müller B, Garn H, Hochscheid R: Impaired recycling of surfactant-like liposomes in type II pneumocytes from injured lungs, *Thorax* 2003; 58: 127-134
58. Müller B, Seifart C, von Wichert P, Barh PJ: Adaption of rat type II pneumocytes to NO₂: effects of NO₂-application mode on phosphatidylcholine metabolism, *Am J Respir Cell Biol* 1998; 18: 712-720
59. Niewohner DE, Kleinermann J, Rice DB: Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers, *N Engl J Med* 1974; 291: 755-758
60. Nocturnal Oxygen Therapy Trial Group: Continuous or nocturnal oxygen therapy in hypoxemic chronic obstructive lung disease: A clinical trial, *Ann Intern Med* 1980; 93: 391-398
61. O'Donnell DE, Lam M, Webb KA: Measurement of symptoms, lung hyperinflation, and endurance during exercise in chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1557-1565
62. Oldmixon EH, Butler JP, Hoppin jr. FG: Lengths and topology of alveolar septal borders, *J Appl Physiol* 1989; 67(5): 1930-1940

63. Oldmixon EH, Hoppin jr FG: Distribution of elastin and collagen in canine lung alveolar parenchyma, *J Appl Physiol* 1989; 67(5): 1941-1949
64. Parent RA: Comparative Biology of the normal Lung, 1992; Boca Raton, CRC
65. Pasquali-Ronchetti I, Fornieri C, Baccarani-Contri M, Quaglino D: Ultrastructure of elastin, In: *The molecular biology and pathology of elastic tissues*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 192) 1995; 31-50
66. Paigen K: A miracle enough: The power of mice, *Nature Med* 1995; 1: 215-220
67. Pastrana-Rios B, Flach CR, Brauner JW, Mautone AJ, Mendelsohn R: A direct test of the “squeeze-out” hypothesis of lung surfactant function. External reflection FT-IR at the air/water interface, *Biochemistry* 1994; 33(17): 5121-5127
68. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS: Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (GOLD) Workshop summary, *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256-1276
69. Roth MD et al: Feasibility of retinoids for the treatment of emphysema study, *Chest* 2006; 130: 1334-1345
70. Sahebajami H: Lung tissue elasticity during lifespan of Fischer 344 rats, *Exp Lung Res* 1991; 17: 887-902
71. Sahebajami H: Nutrition and the pulmonary parenchyma, *Clin Chest Med* 1986; 7: 111-126
72. Sanet JM, Marburg MC, Spengler JD: Health effects and sources of indoor air pollution, part I, *Am Rev Respir Dis* 1987, 136: 1486-1508
73. Scherle W: A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology, *Mikroskopie* 1970; 26: 57-60
74. Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF: Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1791-1797
75. Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, Pierce JA: The induction of pulmonary emphysema induced with human leukocyte elastase, *Am Rev Respir Dis* 1977; 116: 469-475
76. Shapiro SD: Animal models for COPD, *Chest* 2000; 117: 223S-227S

77. Shapiro SD: The pathogenesis of emphysema: the elastase:antielastase hypothesis 30 years later, *Proc Ass Am Phys* 1995; 107(3): 346-352
78. Sin DD, Tu JV: Inhaled corticosteroids and the risk of mortality and readmission in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:580-584
79. Snider GL: Collagen vs elastin in pathogenesis of emphysema, cellular origin of elastase, bronchiolitis vs emphysema as a cause of airflow obstruction, *Chest* 2000; 117: 244S-246S
80. Snider GL, Kleinermann JL, Thurlbeck WM, et al: Definition of emphysema. Report of a National Heart, Lung and Blood Institute, Division of Lung Diseases, *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 182-185
81. Snider G, Lucey EC, Christensen TG, et al: Emphysema and bronchial secretory cell metaplasia induced in hamsters by human neutrophil products, *Am Rev Respir Dis* 1984; 155-160
82. Stang P, Lydick E, Silberman C, Kempel A, Keating ET: The prevalence of COPD. Using smoking rates to estimate disease frequency in the general population, *Chest* 2000; 117: 354S-359S
83. Stavert DM, Archuleta DC, Holland LM, Lehnert BE: Nitrogen dioxide exposure and development of pulmonary emphysema, *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1986; 17: 249-267
84. Stevens A, Lowe J: Kapitel 4, In: *Histologie des Menschen*, 2. Aufl. 1997; Chapman&Hall
85. Sullivan SD, Ramsey SD, Lee TA: The economic burden of COPD, *Chest* 2000; 117: 5S-9S
86. Sullivan SD, Strassels SA, Smith DH: Characterization of the costs of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in the US [abstract], *Eur Respir J* 1996; 9(suppl 23): 421S
87. United States Department of Health, Education and Welfare: Criteria for a recommended standard... occupational exposure to oxides of nitrogen (nitrogen dioxide and nitric oxide), *HEW publication No. (NIOSH) 76-149* 1976; USA
88. Valerius KP: Size-dependent morphology of the conductive bronchial tree in four species of myomorph rodents, *Morphology* 1996; 230(3): 291-297

89. Von Neergard K: Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen, *Z ges exp Med* 1929; 66: 373-394
90. Wegmann M, Fehrenbach A, Heimann S, Fehrenbach H, Renz H, Garn H, Herz U: NO₂-induced airway inflammation is associated with progressive airflow limitation and development of emphysema-like lesions in C57BL/6 mice, *Exp Tox Path* 2005; 56: 341-350
91. Weibel ER: Design and development of the mammalian lung, In: *Weibel ER: The pathway of oxygen* 1984; Cambridge Mass.
92. Weibel ER: Lung Cell Biology, In: *Weibel ER: The pathway of oxygen* 1984; Cambridge Mass.
93. Weibel ER, Gil J: Structure-function relationships at the alveolar level, In: *West JB: Bioengineering aspects of the lung* 1977; Marcel Dekker Inc.
94. Weibel ER, Taylor CR: Design and structure of the human lung, In: *Fishman AP (ed): Pulmonary diseases and disorders, Vol. 1* 1988; Mc Graw-Hill, New York
95. Wiebe BM, Laursen H: Lung morphometry by unbiased methods in emphysema: Bronchial and blood vessel volume, alveolar surface area and capillary length, *APMIS* 1998; 106: 651-656
96. Williams MC: Alveolar type I cells: Molecular phenotype and development, *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 669-695
97. Wood JP, Kolassa JE, McBride JT: Changes in alveolar septal border lengths with postnatal lung growth, *Am J Physiol* 1998; (*Lung Cell Mol Physiol* 19) 275: L1157-L1163
98. Wright JL, Churg A: Animal models for cigarette smoke-induced COPD, *Chest* 2002; 122: 301S-306S
99. Zimmermann GS: Zur Bedeutung von Apoptose und Proliferation bei Stickstoffdioxid-Exposition der Lunge, 2007

9. Abkürzungen

cm	Zentimeter
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ElMi	Elektronenmikroskop
Elas	Elastin
Endo	Endothel
Epi	Epithel
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen (Einsekundenkapazität)
GA	Glutaraldehyd
Int	septales Interstitium
Kap	Kapillare
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
Ko	Kontrolle
Koll	Kollagen
LiMi	Lichtmikroskop
M	molar
mbar	Millibar
min	Minute
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
Na	Natrium
nm	Nanometer
NO ₂	Stickstoffdioxid
OsO ₄	Osmiumtetroxid
P	Punkte
Par	Parenchym
Pn I	Pneumozyt Typ I
Pn II	Pneumozyt Typ II
PBS	Phosphatpuffer
PFA	Paraformaldehyd
ppb	parts per billion
ppm	parts per million

R	Ratio
Sept	Septum
V	Volumen
V _v	relatives Volumen

Anhang

Meine akademischen Lehrer

waren die Damen und Herren

Der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn:

Baur, Bause, Bidlingmaier, Biersack, Büssow, Ernst, Falkai, Göthert, Grote, Hoeft, Keller, Lewalter, Matz, Merklein, Pfeiffer, Schaal, Schott, Seitz, Spatkowski, Vögtle, Wulfhekel

Der Philipps-Universität Marburg:

Arnold, Barth, Baum, Christiansen, Griss, Happle, Hofmann, Krieg, Kroll, Moll, Mutters, Oertel, Remschmidt, Schmidt, Vohland, Werner, Wulf

Des St. Marienkrankenhauses Siegen (Akademisches Lehrkrankenhaus der Philipps-Universität Marburg):

Dölken, Freudenberg, Korz

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Heinz Fehrenbach herzlich danken. Er hat mich während meiner gesamten Promotion hervorragend betreut und stand mir bei Fragen und Problemen stets zur Verfügung.

Ich danke Fr. Roswitha Naumann für die Unterstützung in der Anfertigung der elektronenoptischen Präparate sowie für die technische Einarbeitung am Elektronenmikroskop.

Fr. Dr. Antonia Fehrenbach danke ich für die Einarbeitung in die stereologische Auswertung der elektronenoptischen Präparate.

Danken möchte ich Gregor Zimmermann für die Mitbetreuung der Versuchstiere sowie für die Bereitstellung der von ihm am Lichtmikroskop erhobenen Daten.

Mein Dank gilt auch meiner Familie. Meine Eltern Hanni und Jürgen Starke haben mich während meines gesamten Studiums und auch in der Phase meiner Promotion immer bedingungslos unterstützt. Mit ihrer moralischen und auch finanziellen Hilfe haben sie die Anfertigung dieser Dissertation erst ermöglicht.